

Université de Montréal

**Évaluation de l'association entre l'exposition postnatale  
aux  $p,p'$ -DDT et  $p,p'$ -DDE et l'indice de masse  
corporelle chez les enfants japonais**

par Laurence Plouffe

Département de santé environnementale et santé au travail,

École de santé publique de l'Université de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Science (M. Sc.)  
en santé environnementale et santé au travail

Option recherche

Décembre 2018

© Laurence Plouffe, 2018

## Résumé

Les enfants sont exposés au *p,p'*-dichlorodiphényltrichloroéthane (*p,p'*-DDT) et au *p,p'*-dichlorodiphényldichloroéthylène (*p,p'*-DDE) par transfert placentaire et par le lait maternel. Plusieurs études laissent croire que cette exposition pourrait avoir un impact sur l'indice de masse corporelle (IMC) pendant l'enfance. Le but de notre étude était d'évaluer l'association entre l'exposition par le lait maternel et l'IMC des enfants japonais âgés de 42 mois. Nous avons utilisé les données d'une étude pilote (n=290) de la *Japan Environment and Children Study* (JECS). Le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE ont été mesurés dans le lait maternel, et les concentrations chez l'enfant ont été estimées pour trois périodes (0-6 mois, 6-12 mois, 12-24 mois) à l'aide d'un modèle de toxicocinétique. Les associations avec l'IMC à 42 mois ont été évaluées à l'aide de modèles de régression linéaire multivariée. Aucune association n'a été observée avec les concentrations de *p,p'*-DDT mesurées dans le lait maternel, ni avec les concentrations estimées chez les enfants. Des associations positives avec les concentrations de *p,p'*-DDE estimées ont été observées chez les filles. Chaque augmentation d'un logarithme naturel dans les concentrations estimées était associée avec une augmentation du score z de l'IMC de 0.23 (I.C. 95% : 0.01, 0.45) pour la période d'exposition 0-6 mois, de 0.26 (I.C. 95% : 0.06, 0.47) pour la période 6-12 mois, et de 0.24 (I.C. 95% : 0.05, 0.43) pour la période de 12-24 mois. Ces associations étaient dans le même ordre de grandeur que l'association observée dans une méta-analyse publiée récemment (augmentation du score z de l'IMC de 0.13 par augmentation d'un logarithme naturel dans l'exposition prénatale), ce qui supporte l'hypothèse que l'exposition développementale au *p,p'*-DDE est associée avec une augmentation de l'IMC durant l'enfance.

**Mots-clés :** dichlorodiphényltrichloroéthane, dichlorodiphényldichloroéthylène, polluants organiques persistants, indice de masse corporelle (IMC), exposition postnatale, lait maternel, modélisation toxicocinétique

## Abstract

Children are exposed to *p,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane (*p,p'*-DDT) and *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE) through placental and lactational transfer. Studies have revealed that these exposures could lead to increased body mass index (BMI) during childhood. Our aim was to assess whether exposure through breast milk is associated with BMI in Japanese children at 42 months of age. We used data from a pilot study (n=290) of the Japanese Environment and Children Study (JECS). *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE levels were measured in breast milk, and levels in children were estimated using a toxicokinetic model for three exposure periods (0-6 months, 6-12 months, 12-24 months). Associations with BMI at 42 months of age were assessed using multivariate linear regression models. Our study revealed no significant association with levels of *p,p'*-DDT measured in breast milk or estimated in children. Positive associations with *p,p'*-DDE were found in girls during all exposure periods. For each log increase in the estimated *p,p'*-DDE levels, BMI z-score increased by 0.23 (C.I. 95%: 0.01, 0.45) for the 0-6 months exposure period, 0.26 (C.I. 95%: 0.06, 0.47) for the 6-12 months exposure period and 0.24 (C.I. 95%: 0.05, 0.43) for the 12-24 months exposure period. Our results in girls were similar to those found in a previous meta-analysis that included boys and girls (BMI z-score increase of 0.13 by log increase in prenatal *p,p'*-DDE levels), supporting that early-life exposure to *p,p'*-DDE may be associated with increased BMI during childhood.

**Keywords** : dichlorodiphenyltrichloroethane, dichlorodiphenyldichloroethylene, persistent organic pollutants, body mass index (BMI), postnatal exposure, breast milk, toxicokinetic modeling

# Table des matières

Résumé.....	i
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des sigles .....	viii
Remerciements.....	ix
Introduction.....	1
Le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) .	1
Production et utilisation .....	1
Sources d'exposition.....	2
Sources naturelles et artificielles .....	2
Comportement dans l'environnement.....	4
Changements climatiques .....	5
Exposition de la population générale.....	6
Exposition des jeunes enfants .....	7
Toxicocinétique.....	7
Absorption.....	8
Distribution .....	9
Métabolisme.....	9
Excrétion .....	10
Toxicité .....	10
Valeurs toxicologiques de référence, normes et réglementations.....	12
Biosurveillance .....	13
Modélisation .....	14
La modélisation toxicocinétique.....	14
La modélisation toxicocinétique du transfert mère-enfant .....	15
Problématique .....	15
Objectifs de recherche.....	16
Méthode .....	17

Description de l'étude .....	17
Participants.....	17
Collecte des données.....	18
Traitement et analyse des échantillons .....	18
Traitement du lait maternel.....	18
Quantification des biomarqueurs d'exposition .....	19
Expression des concentrations dans le lait maternel sur base lipidique.....	19
Analyse toxicocinétique.....	20
Considérations éthiques .....	21
Article .....	23
Contribution des auteurs .....	23
Estimated postnatal p,p'-DDT and p,p'-DDE levels in Japanese children and body mass index at 42 months of age .....	26
Abstract.....	27
Introduction.....	28
Materials and Methods.....	30
Study participants.....	30
Data Collection .....	31
Chemical Analysis .....	31
Toxicokinetic model .....	32
Statistical Analysis.....	33
Results.....	34
Participant characteristics .....	34
Measured and estimated exposure metrics .....	36
Associations between p,p'-DDT and p,p'-DDE and children's BMI z-score .....	36
Discussion .....	39
Conclusions.....	42
Acknowledgments.....	42
References .....	43
Supplemental material .....	47
Discussion générale et conclusion .....	51

Évaluation de l'approche utilisée et apport de l'étude.....	51
Comparaison avec d'autres études.....	51
Perspectives.....	52
L'allaitement comme voie d'exposition .....	52
Utilisation de modèles toxicocinétique en recherche.....	53
Santé publique.....	54
Conclusion .....	55
Bibliographie.....	56
Annexe 1 : Règlement sur certaines substances toxiques interdites .....	65
Annexe 2 : Distribution des données originales et imputées .....	66
Annexe 3 : Approbation éthique du Comité d'éthique de la recherche en santé de l'Université de Montréal .....	68

## Liste des tableaux

Table 1. Characteristics of study participants. ....	35
Table 2. Measured breast milk and estimated children's concentrations (ng/g-lipid) among participating children from birth to 24 months of age (n=290) .....	36
Table 3. Associations between measured breast milk or estimated children's <i>p,p'</i> -DDT and <i>p,p'</i> -DDE and BMI z-score at age 42 months. ....	38
Correlations between breastfeeding duration and areas under the curve for <i>p,p'</i> -DDT .....	48
Correlations between breastfeeding duration and areas under the curve for <i>p,p'</i> -DDE .....	49
Substances toxiques interdites .....	65

## Liste des figures

Figure 1. Composés contenus dans le mélange de DDT commercial.....	2
Figure 2. Conceptual representation of the pharmacokinetic model .....	32
Directed acyclic graph .....	50



## Liste des sigles

AcsIX : Advanced continuous simulation language eXtreme

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry

AUC : Aire sous la courbe (*Area under the curve*)

BMI : *body mass index*

CCME : Canadian Council of Ministers of the Environment

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

IMC : Indice de masse corporelle

OMS : Organisation mondiale de la santé

*p,p'*-DDE : *p,p'*-dichlorodiphényldichloroéthylène

*p,p'*-DDT : *p,p'*-dichlorodiphényltrichloroéthane

TSCD : *Tohoku Study of Child Development*

U.S. EPA : *United States Environmental Protection Agency*

UNEP : *United Nations Environment Program*

WHO : *World Health Organization*

# Remerciements

J'aimerais remercier certaines personnes qui ont rendu possible ce projet de recherche par leur soutien continu au cours de ces dernières années.

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de maîtrise, Marc-André Verner, de m'avoir enseigné, conseillé et encouragé dans la navigation à travers toutes les étapes d'une maîtrise en recherche. Son expertise m'a été essentielle et je suis très reconnaissante de son engagement et de son implication.

Ensuite, j'aimerais souligner l'apport de plusieurs collaborateurs qui se sont investis dans le projet à différentes étapes et sans qui ce dernier ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui. En premier, je voudrais remercier Shoji F. Nakayama pour m'avoir accueilli lors de mon séjour au Japon. Il a toujours été présent pour répondre à mes questions malgré la distance. J'aimerais aussi remercier Lina Madaniyazi et Miyuki Iwai Shimada, qui m'ont aidé avec la manipulation des données et leur analyse pendant toute la durée du projet. Finalement, j'aimerais remercier Delphine Bosson-Rieutort, qui n'a pas hésité à m'aider dans les derniers milles de l'analyse des données et qui m'a offert son temps et son expertise. J'en suis extrêmement reconnaissante.

J'aimerais aussi remercier mes collègues et amies au laboratoire de Marc-André Verner : Élyse Caron-Beaudoin, Inna Traore et Sherri Bloch pour leur aide et leurs encouragements. Vous avez égayé mon séjour au pavillon Marguerite d'Youville et j'ai déjà hâte à nos sorties!

Et pour terminer, je veux remercier mon conjoint Olivier pour s'être transformé en psychologue, humoriste, cuisinier, massothérapeute, programmeur, gestionnaire, homme de ménage, et bien plus, dès que j'en avais besoin. Ses encouragements et sa confiance en mes capacités ont été très appréciés pendant la réalisation de mon projet.

# Introduction

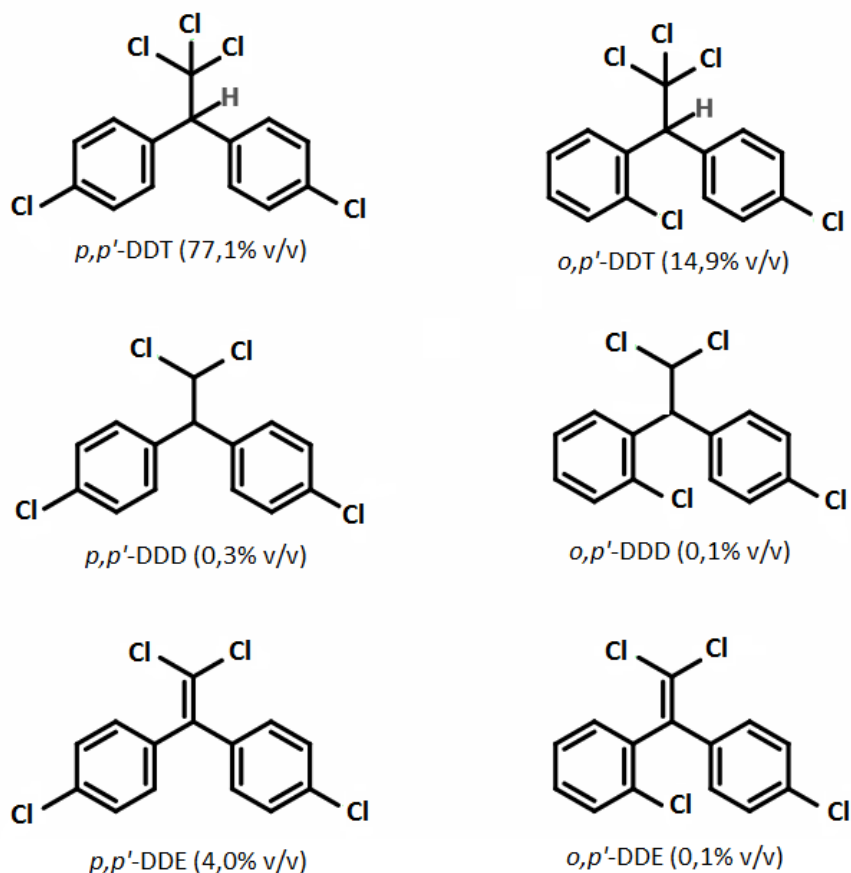
## Le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE)

### Production et utilisation

Le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) est un composé synthétisé pour la première fois en 1874. Ses propriétés insecticides furent découvertes en 1939. Il a été utilisé pendant la Deuxième Guerre mondiale par les militaires et les civils afin d'éradiquer les maladies à transmission vectorielle telles que la malaria et le typhus (2, 3). Il a aussi été utilisé comme pesticide agricole dans de nombreux pays. Son efficacité, son faible coût et sa persistance font de cet insecticide à large spectre un produit hautement appliqué (2). Il atteint son pic de popularité en 1962, où 85 000 tonnes sont produites aux États-Unis (2). En 2002, il était estimé que la production mondiale de DDT s'élevait à deux millions de tonnes (2). La *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) a banni la production et l'utilisation de ce pesticide aux États-Unis en 1972, avec pour seule exception les cas d'urgence de santé publique (2, 3). Au Japon, le DDT fut banni en 1981. En 1991, le DDT est banni comme pesticide agricole ou comme insecticide à usage domestique dans 26 pays (4). Plusieurs autres pays en ont fait de même ou ont resserré leurs règles d'utilisation en 2004, suite à la Convention de Stockholm (5). De nos jours, le *p,p'*-DDT est toujours produit en Inde (6). Il est estimé qu'en 2014, environ 3140 tonnes étaient utilisées pour combattre la malaria dans certains pays africains et en Inde, ce dernier étant responsable de la production de 96-97 % de cette quantité (6).

Le *p,p'*-dichlorodiphényltrichloroéthane (*p,p'*-DDT) est l'isomère principal du DDT. Le *p,p'*-dichlorodiphényldichloroéthylène (*p,p'*-DDE) est le métabolite principal du *p,p'*-DDT. Les préparations commerciales de DDT contiennent environ 4 % de *p,p'*-DDE sous forme d'impureté (voir Figure 1) (7). C'est sur ces composés que nous nous concentrons dans le cadre de la présente étude.

Figure 1. Composés contenus dans le mélange de DDT commercial



## Sources d'exposition

### Sources naturelles et artificielles

Malgré le fait que le DDT ne soit plus utilisé en agriculture depuis des dizaines d'années, ce contaminant et ses métabolites sont toujours retrouvés dans l'environnement. Ce phénomène est dû à la persistance du *p,p'*-DDT et du *p,p'*-DDE en addition au fait que le DDT soit toujours utilisé dans une douzaine de pays afin de combattre la malaria (8, 9). En plus de leur persistance, ces composés sont lipophiles; ils s'accumulent donc dans les tissus adipeux et sont bioamplifiés dans la chaîne trophique (7). Le *p,p'*-DDE est aussi retrouvé dans l'environnement, car il est un produit stable de la dégradation du *p,p'*-DDT (2, 10).

Pendant son utilisation comme pesticide, une grande quantité de DDT fut libérée dans le sol; le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE sont donc encore présents dans certains sites et sont relâchés dans l'environnement (2). De nos jours, le DDT et ses métabolites peuvent être transportés sur de longues distances dans l'atmosphère et se déposer dans des régions éloignées de la source initiale (11). Cependant, les niveaux mesurés dans le sol représentent l'utilisation historique de ces contaminants. Plusieurs années après l'interdiction de l'utilisation du DDT, nous retrouvons toujours des niveaux considérables de *p,p'*-DDT dans le sol dans plusieurs pays (12, 13).

Le DDT peut se déposer à la surface des plans d'eau lors de son utilisation pour combattre la malaria (2). Même lorsqu'il n'est plus utilisé, le DDT et ses métabolites peuvent se retrouver dans les cours d'eau suite à l'érosion des sols et le ruissellement dans les zones agricoles (2). Effectivement, une étude faite en 1996 par Brevik et coll. (14) a démontré que, 19 ans après la fermeture d'une usine de production de DDT, les niveaux de contaminants mesurés dans l'eau et les poissons près du site étaient cinq à dix fois plus élevés que dans les lacs non contaminés. L'exposition de l'humain par la consommation d'eau contaminée est toutefois considérée comme négligeable (2). D'après Barnhoorn et coll. (15), lors de leur étude dans une région africaine où le DDT est toujours utilisé pour combattre la malaria, les niveaux retrouvés dans les cours d'eau n'entraînent probablement pas de risque pour les humains. En effet, les concentrations mesurées étaient sous la limite établie par l'OMS de 2 ug/L dans l'eau potable. Les auteurs émettent cependant une réserve par rapport à ces niveaux, car ils pourraient changer en fonction du temps de collecte par rapport au moment d'utilisation du pesticide (15).

Lors de l'épandage de DDT dans les champs ou les forêts, l'air devenait une source d'exposition au *p,p'*-DDT et au *p,p'*-DDE. Ce phénomène n'a plus lieu d'être dans la plupart des pays, sauf dans ceux qui continuent à utiliser ce pesticide pour lutter contre la malaria (2).

La poussière de maison est une source d'exposition très importante et persistante dans les pays qui ont utilisé ou utilisent toujours cette substance. La population générale et les enfants en particulier y sont exposés. Une étude menée au Mexique a mesuré des niveaux de contaminant plus élevés dans les poussières de maison que dans le sol

environnant dix ans suivant la cessation de l'utilisation de DDT. Les niveaux mesurés dans cette étude étaient plus élevés que les normes canadiennes et californiennes (13).

### **Comportement dans l'environnement**

Le *p,p'*-DDT se dégrade en *p,p'*-DDE principalement grâce aux procédés de dégradation chimiques comme la photodégradation (10) ou par l'action de microorganismes présents dans le sol, comme les bactéries, fungus et algues par déhydrohalogénéation (7, 16). Ce processus peut se faire autant dans des conditions aérobiques qu'anaérobiques (16). La vitesse de dégradation est influencée par le type de sol, la température, la luminosité, l'humidité du sol et son contenu en carbone organique (16, 17). Le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE peuvent voyager dans l'environnement par solubilisation, absorption, bioaccumulation, volatilisation, par les courants, le vent et la diffusion (2).

**Sol.** Dans des conditions propices, le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE peuvent rester dans le sol pendant plusieurs dizaines d'années. La température, l'altitude, le type de sol, le niveau d'activité des microorganismes, la vitesse d'évaporation, la présence d'oxygène, l'humidité, le pH, le type de forêt et le type de mousse présent sont des facteurs qui influencent la persistance de ces composés dans le sol (2, 12). Plus le sol est humide, moins longtemps ces composés y restent (2). Dans les régions tropicales, ils peuvent disparaître en moins d'un an; la demi-vie du mélange de DDT varie entre 22 et 327 jours (2, 16). Dans les régions tempérées, le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE ont une demi-vie allant de deux à seize ans (16, 18). Le *p,p'*-DDE se lie fortement aux particules du sol et a tendance à rester dans la couche supérieure (2, 16). Il a une faible solubilité dans l'eau, ce qui explique qu'il puisse se volatiliser lorsque les sols sont humides (16). Lorsque les sols sont secs, il a une biodisponibilité faible, car il est plus fortement lié aux particules. La perte de *p,p'*-DDE résulte plutôt du déplacement de ces particules et à la photooxydation (16). À partir du sol, les contaminants peuvent se retrouver dans les eaux de surface grâce au ruissellement ou être absorbés par les plantes et entrer dans la chaîne trophique (2).

**Eau.** Le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE sont peu solubles dans l'eau (2). Le *p,p'*-DDE se volatilise facilement et peut être dégradé par photolyse (16). Ces composés peuvent se lier

à des particules dans l'eau et peuvent être absorbés par les organismes aquatiques comme le zooplancton et les poissons (2, 16).

**Air.** Dans les régions où le DDT n'est plus utilisé, ce dernier et ses contaminants peuvent entrer dans l'air suite à leur volatilisation à partir de sols humides ou de l'eau de surface (2). Ce phénomène a tendance à se produire dans les climats chauds (16). Les températures basses comme celles retrouvées en altitude ou les régions plus froides favorisent la déposition des contaminants (12). Cela pourrait expliquer pourquoi on retrouve des concentrations élevées dans ces régions malgré le fait qu'il n'y ait pas eu d'utilisation ou de production (12). Effectivement, ces contaminants ont été retrouvés jusque dans des tourbières et marais, dans des animaux et dans la neige de l'Arctique et de l'Antarctique (2). Cependant cette théorie est controversée, car la demi-vie de ces composés sous forme de vapeur va de 36 à 72 heures, ce qui serait trop court pour de longs déplacements. Le DDT peut toutefois se lier à la matière particulaire, ce qui allonge sa durée de vie dans l'atmosphère et rend possible les déplacements sur de longues distances (2). L'air a une capacité de stockage faible pour les polluants organiques persistants. Dans un environnement où il y a beaucoup de mouvements de l'air, le DDT et ses métabolites peuvent être éliminés très rapidement (19).

### **Changements climatiques**

Les changements climatiques pourraient modifier la distribution des contaminants présents dans l'environnement de plusieurs façons, car les processus entourant leur transport et distribution dépendent de la température, des vents, des précipitations et des radiations solaires (20, 21). Comme les processus de décomposition des contaminants se fait plus lentement dans les températures froides (20), la calotte glacière renferme une quantité importante de contaminants qui s'y sont déposés avec le temps (22). Elle agit aussi comme barrière entre l'atmosphère et l'eau, empêchant les contaminants de passer d'une phase à l'autre (22). La fonte des glaces entraînera donc une remobilisation des contaminants emprisonnés vers les cours d'eau, les rendant disponibles au transport et à l'absorption par les organismes marins (22, 23) et augmentant l'exposition de la population à travers l'eau potable (11). La volatilisation des contaminants libérés des sources secondaires sera facilitée par l'augmentation de la température. Effectivement, une

augmentation de 5°C double la pression de vapeur du *p,p'*-DDT, ce qui lui permet de voyager sur de plus longues distances (21, 22). Ce phénomène entraînera une plus grande mobilité et dispersion des contaminants environnementaux (22, 23). L'augmentation des précipitations entraînera aussi une plus grande déposition de contaminants dans des endroits qui y étaient normalement moins exposés (23). De plus, le changement du trajet migratoire des oiseaux pourra aussi modifier le déplacement de ces contaminants puisqu'ils pourraient agir comme vecteur de transport (23). Finalement, l'augmentation de la fréquence des événements météorologiques extrêmes, tels les feux de forêt et les inondations, aura un impact sur la remobilisation et la distribution des contaminants (22).

### **Exposition de la population générale**

La voie d'exposition principale de la population au *p,p'*-DDT et *p,p'*-DDE est la nourriture (24). Ces contaminants sont bioaccumulables et bioamplifiables dans les organismes de la chaîne alimentaire et sont retrouvés majoritairement dans la viande, le poisson, la volaille et les produits laitiers (2, 16, 25). Dû à leur caractère lipophile, ils s'accumulent dans les tissus adipeux des organismes exposés. Comme le DDT est métabolisé et transformé en *p,p'*-DDE (et autres métabolites), le ratio *p,p'*-DDT/*p,p'*-DDE dans les échantillons biologiques peut donner des indications sur la source et le moment de l'exposition (26). Un ratio supérieur à 0,91 signifie une utilisation probable de DDT dans les cinq dernières années (27). Il ne faut pas exclure la possibilité de sources secondaires, comme la libération de résidus de pesticides auparavant liés aux sédiments dans le sol ou à la déposition atmosphérique de nouvelles particules (10). Par exemple au Japon, des concentrations élevées de *p,p'*-DDT et de *p,p'*-DDE ont été mesurées dans les poissons consommés dans les îles du sud-ouest du pays (28). Il est possible que la proximité avec d'autres pays de l'Asie du Sud-Est, où ce pesticide est encore utilisé, explique cette contamination (28). En Espagne, les ratios mesurés dans le sol indiquent une source nouvelle de ces contaminants malgré l'interdiction d'utilisation et de production en 1994 (10). En raison de ces phénomènes, même si les concentrations mesurées sont en déclin, il est estimé que de faibles niveaux seront encore retrouvés dans notre alimentation pendant des décennies (2, 16).



De nos jours, l'atmosphère peut contenir des résidus de polluants organiques persistants, qui peuvent être absorbés par la cuticule cireuse des plantes (11). Les légumes à feuille sont les légumes les plus touchés, partiellement en raison de la déposition de contaminants de l'air sur leurs feuilles (2).

Dans les pays où le DDT n'est plus utilisé, l'exposition par l'air est considérée comme minime. L'exposition par inhalation touchait principalement les travailleurs qui produisaient ou manipulaient le DDT (2). Cette voie d'exposition est toutefois importante dans les régions où ce composé est utilisé afin de combattre la malaria, en particulier dans les résidences (2). L'exposition par l'ingestion d'eau est elle aussi négligeable en raison de la faible solubilité de ces contaminants (2).

### **Exposition des jeunes enfants**

Les enfants sont exposés aux *p,p'*-DDT et *p,p'*-DDE par les transferts mère-enfant. Ceux-ci se produisent avant la naissance par transfert placentaire (26), et après la naissance par l'allaitement (2). En bas âge, le lait maternel est leur unique ou principale voie d'alimentation et d'exposition aux *p,p'*-DDT et *p,p'*-DDE (29). En raison de leur caractère lipophile, ces contaminants s'accumulent dans les lipides du lait maternel et sont transférés à l'enfant par l'allaitement (30). Le lait maternel contiendrait plus de contaminants lipophiles que le lait de vache et les préparations commerciales. Bien que les concentrations retrouvées dans le lait maternel soient en déclin, les enfants allaités seraient plus exposés que ceux nourris avec des préparations commerciales (2, 31). Le niveau d'exposition des enfants dépend donc de celui de leurs mères; les femmes qui consomment beaucoup de poisson et les femmes plus âgées qui n'ont pas d'autre enfant transmettront plus de contaminants à leur enfant (30, 31). Les enfants peuvent aussi être exposés au *p,p'*-DDT et au *p,p'*-DDE en ingérant des poussières ou de la terre ou en jouant sur de vieux tapis dans des zones contaminées, car le DDT et ses métabolites se lient fortement aux sédiments (2, 13).

### **Toxicocinétique**

La section suivante traitera de la toxicocinétique liée à une exposition par voie orale, puisque c'est la voie d'exposition la plus importante dans la population présentée

dans ce document. Chez les enfants, la toxicocinétique est influencée par les grands changements physiologiques et biochimiques qui se produisent pendant les premiers mois à années de vie. Les enfants ne sont pas de petits adultes. Une compréhension approfondie est nécessaire lorsque l'on veut étudier le comportement de contaminants ou de médicaments chez cette population (32). Les spécificités relatives aux enfants sont toutefois peu connues en raison des considérations éthiques et techniques liées aux études cliniques dans cette population (33).

### **Absorption**

Le DDT et ses métabolites sont absorbés par le système gastro-intestinal. Plusieurs études recensées dans un rapport de l'*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) ont montré que le DDA, un des métabolites du DDT, était retrouvé dans l'urine de souris, rats et hamsters exposés (2). Des études chez les rats ont aussi montré que le mélange de DDT était mieux absorbé lorsqu'il était mélangé à de l'huile, en particulier l'huile d'arachide (34). La nature de l'huile influencerait le degré d'absorption en affectant la capacité de la bile à solubiliser les molécules lipophiles (34).

Le processus d'absorption est influencé par plusieurs facteurs dépendant de l'anatomie, comme des changements de pH gastrique, de solubilité, de présence et d'action d'enzymes spécifiques, etc. (35). Pendant les deux premières années de vie, le pH gastrique change, ce qui modifie le degré de dégradation du contenu de l'estomac, influençant la vitesse d'absorption dans les intestins (35). De plus, la vitesse de vidange gastrique est ralentie pendant les jours suivant la naissance, ce qui ralentit l'absorption intestinale (33). La vitesse de vidange intestinale, quant à elle, est plus lente chez les nouveau-nés et plus rapide chez les jeunes enfants, si on compare avec les adultes (33). La bile, qui favorise l'absorption des lipides et donc des composés lipophiles, est en quantité réduite dans les premiers mois, ce qui diminue la biodisponibilité de ces molécules (33). Finalement, le pancréas, qui atteint sa maturité à deux ans, produit des enzymes qui neutralisent les sucs gastriques, aidant à la digestion, et qui aident à solubiliser les lipides. Leur absorption est donc plus faible lorsque le pancréas est immature (33).

## Distribution

Le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE sont distribués dans le sang et la lymphe et sont emmagasinés dans les tissus adipeux (36, 37). Ce processus dépend du flux sanguin et du coefficient de partition entre le sang et les tissus (2). Dans le cas du *p,p'*-DDT et du *p,p'*-DDE, qui sont hautement lipophiles, leur coefficient de partition sang:tissus est égal au ratio de lipides dans les tissus adipeux et le sang (38). Ils y restent emmagasinés pendant plusieurs années considérant leurs demi-vies biologiques qui sont d'environ 5 ans pour le *p,p'*-DDT et 13 ans pour le *p,p'*-DDE (18, 39). Ces contaminants peuvent traverser le placenta; les concentrations mesurées dans le sang ombilical sont similaires à celles du sang maternel lorsqu'elles sont exprimées sur une base de lipides (36). Ces contaminants sont aussi emmagasinés dans le lait maternel, en raison de sa haute teneur en lipides (40).

La distribution dépend de la composition des tissus et fluides. Ces compositions connaissent des changements importants pendant les premières années de vie, ce qui modifie considérablement ce paramètre (35). De plus, le volume lipidique (dans lequel le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE se retrouvent principalement) est plus petit chez les jeunes enfants, ce qui peut mener à une plus grande concentration de composés lipophiles pour une même dose externe (35).

## Métabolisme

Chez l'humain exposé par voie orale, le *p,p'*-DDT est dégradé en *p,p'*-DDE par déhydrodéchlorination (37). Une petite quantité est aussi dégradée en *p,p'*-DDD par une réaction de déchlorination réductive (41). Ce dernier métabolite est ensuite dégradé en *p,p'*-DDA qui sera excrété dans l'urine (37, 41). La dégradation du *p,p'*-DDE est peu efficace et très lente; il est plutôt emmagasiné dans les tissus adipeux (37).

Les enzymes responsables du métabolisme du *p,p'*-DDT et du *p,p'*-DDE connaissent des changements d'expression durant le développement. Par exemple, les niveaux d'expression de certaines enzymes chez les enfants peuvent différer de ceux d'un adulte pendant quelques mois à années. Également, certaines enzymes n'arrivent à maturité que quelques semaines après la naissance. Ces particularités peuvent influencer la demi-vie des xénobiotiques (35).

## Excrétion

Le DDT et ses métabolites sont principalement excrétés dans l'urine, sous forme de *p,p'*-DDA (37, 41, 42). Il serait toutefois possible que la quantité de *p,p'*-DDA excrétée soit en lien avec une exposition courante plutôt que de l'élimination de la charge corporelle (41). Les fèces pourraient aussi être une voie d'élimination dans le cas de forte exposition au mélange de DDT (42). Le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE traversent le placenta et sont retrouvés en grande quantité dans le lait maternel, ce qui constitue en une voie d'élimination pour la femme enceinte ou la femme allaitante (43, 44).

Les reins sont responsables de filtrer une grande quantité de métabolites. Ils arrivent à maturité vers un an de vie. Pendant ce temps, la filtration glomérulaire est diminuée, ce qui peut avoir un impact sur la clairance (45).

## Toxicité

Le passage suivant se concentre sur les effets métaboliques et développementaux du DDT et ses métabolites avec un accent sur les marqueurs d'obésité.

Plusieurs études *in vitro* ont investigué le mécanisme d'action du *p,p'*-DDT et du *p,p'*-DDE au sein des tissus adipeux. L'exposition des cellules souches du mésenchyme au *p,p'*-DDT aurait un effet agoniste des récepteurs des œstrogènes et favoriserait la différenciation des cellules en adipocytes (46, 47). Ce contaminant altérerait aussi l'homéostasie du glucose en modifiant différents mécanismes de sécrétion d'insuline (48). De plus, il provoquerait aussi une augmentation de la production de la protéine C/EBP $\alpha$ , qui augmenterait l'adipogénèse et la maturation accélérée de ces nouvelles cellules (49). Quant à l'exposition au *p,p'*-DDE, certains chercheurs estiment qu'elle pourrait jouer un rôle dans la dyslipidémie en augmentant la sécrétion d'apolipoprotéine B (50). Cela aurait pour effet de stimuler la sécrétion de lipides, dont les triglycérides, le cholestérol et les lipoprotéines de très basse densité (51). De plus, cela augmenterait leur transport et nuirait à leur clairance (50). Cette exposition pourrait aussi favoriser l'infiltration de macrophages dans les tissus adipeux, qui est l'un des marqueurs du syndrome métabolique (52).

Les études *in vivo* laissent aussi croire que l'exposition à ces contaminants entraînerait un effet obésogène. Une exposition au *p,p'*-DDT de 12 semaines chez les rats

indique que ce contaminant augmente les risques de souffrir d'hyperinsulinémie et d'intolérance au glucose, altère le métabolisme de la bile et de la thermogenèse et entraîne une diminution de la dépense d'énergie (48, 53). Ces problématiques étaient transmises à la génération F3, bien que l'exposition ait seulement visé la génération F1 (48, 54). Une exposition similaire chez les rats, mais au *p,p'*-DDE, laisse croire qu'il pourrait contribuer à une dysfonction métabolique en altérant le fonctionnement du tissu adipeux mésentérique viscéral et le métabolisme énergétique (55). De plus, ce contaminant agit comme un antagoniste des récepteurs androgènes, ce qui peut avoir un impact sur le développement (56).

Des études épidémiologiques ont aussi observé un lien entre l'exposition des enfants au DDT et ses contaminants et des effets métaboliques. Plusieurs études se concentrant sur l'exposition prénatale au *p,p'*-DDT et au *p,p'*-DDE ont trouvé des associations avec des changements dans divers marqueurs d'obésité. Des chercheurs ont observé un lien entre l'exposition prénatale au *p,p'*-DDT et des mesures plus élevées d'obésité chez les enfants à neuf ans (57). Certains ont découvert une différence entre les sexes, avec des résultats plus importants chez les garçons (58). Le *p,p'*-DDE a aussi été associé à une circonférence de la taille, un indice de masse corporelle (IMC), une obésité abdominale, un poids et un pourcentage de gras corporel plus élevés chez les enfants de quatre à neuf ans (59-61). Certaines études ont rapporté des associations seulement chez les filles (62) et d'autres, seulement chez les garçons (57, 63). Plusieurs études n'ont toutefois noté aucune association significative, autant avec le *p,p'*-DDT que le *p,p'*-DDE et des mesures de poids durant l'enfance (64, 65). La majorité des études sur le sujet portent sur l'exposition prénatale; peu d'entre elles s'intéressent à l'exposition postnatale. Pourtant, la première année de vie est une période critique pour la différenciation et la prolifération des adipocytes (2, 66). De plus, peu d'information est disponible spécifiquement sur les effets potentiels de l'exposition par le lait maternel. Dans les deux études publiées sur le sujet jusqu'ici, l'exposition postnatale n'était pas associée avec plusieurs mesures de croissance pendant la première année de vie, comme le poids, la grandeur, la circonférence de la tête et le pourcentage de masse adipeuse (29, 67).

## **Valeurs toxicologiques de référence, normes et réglementations**

Le DDT fait partie des polluants organiques persistants bannis ou restreints identifiés dans le traité international découlant de la Convention de Stockholm, signé en 2001 par 152 pays. En 2016, 64 % des membres ont déclaré en avoir interdit la production, 74 % l'importation et 82 % l'utilisation agricole (6). Selon nos connaissances actuelles, seule l'Inde reste productrice de cette substance (6). Dans la plupart des pays membres, la réglementation entourant le DDT est encadrée par des lois. Une dérogation existe pour les pays qui utilisent le DDT pour combattre les maladies vectorielles. Ces pays doivent s'inscrire sur le registre du Programme des Nations unies pour l'environnement (68).

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) évaluent ensemble la dose journalière admissible de plusieurs pesticides retrouvés dans l'environnement. Les dernières données datent de 2002, avec une dose journalière admissible pour le DDT de 0,01 mg/kg de poids corporel (69). Au Canada et au Japon, deux pays ayant banni l'utilisation et la production de DDT depuis les années 70 - 80, les médianes des doses journalières estimées étaient de 0,02 ug/kg en 1977 et 0,038 ug/kg en 1983, respectivement (70). Au Canada, le Conseil canadien des ministres de l'environnement a émis une valeur guide maximale de 14 ug/kg de viande animale pour le DDT total (71). Pour les sols résidentiels et agricoles, la limite est fixée à 0,7 mg/kg (72). Selon la US EPA, consommer quotidiennement deux litres d'eau à 0,59 ng de DDT/L et 6,5 g de poisson ou fruits de mer correspond à une augmentation du risque de cancer de 1 : 1 000 000 (73). Au Japon, en 2007, certains aliments venant d'autres pays de l'Asie comportaient encore des doses de DDT plus élevées que la limite maximale de résidus qui est de 0,2 ppm (74).

Au Canada, le DDT fait partie du Tableau 1 des substances toxiques, car il est persistant, bioaccumulable, toxique et résulte de l'activité humaine (75). Tous les stocks ont été détruits et sa vente interdite, conformément à la Loi sur les produits antiparasitaires (76) et au Règlement sur certaines substances toxiques interdites (77). Ce dernier stipule qu'il est interdit de « fabriquer, d'utiliser, de vendre, de mettre en vente ou d'importer toute substance toxique mentionnée à l'Annexe 1 ou tout produit qui en contient » (77). De plus le DDT fait partie du premier tiers de la liste de substances toxiques avec cible

d'élimination virtuelle du bassin des Grands Lacs dans le cadre du Canada-Ontario Agreement Respecting the Great Lakes Basin Ecosystem et de la International Joint Commission (78). L'élimination virtuelle consiste en la prévention des rejets d'une substance dans l'environnement, soit par des stratégies de prévention ou par l'interdiction de la production et de l'utilisation de celle-ci (79).

## **Biosurveillance**

Le groupe de monitoring de la Convention de Stockholm a mis au pied des lignes directrices afin d'assurer une surveillance adéquate du DDT et de ses métabolites dans l'environnement. Ce plan de biosurveillance suggère des méthodes de collecte, d'analyse, de traitement et de déclaration des données (80). Il est de la responsabilité de chaque partie de mettre au point des stratégies et de prendre les mesures nécessaires à l'atteinte des objectifs fixés (81). Au Canada, les mesures de surveillance sont basées sur la Politique de gestion des substances toxiques. Le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE ont été mesurés dans le plasma d'un sous-ensemble de participants de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé (ECMS) entre 2007 et 2009 (82). Au Japon, la biosurveillance alimentaire est menée par le *Ministry of Health, Labour and Welfare*, par le *Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries* ainsi que par des groupes régionaux de consommateurs et des coopératives agricoles (74).

Le DDT et ses métabolites peuvent être détectés dans les tissus adipeux, le sang, l'urine, le sperme et le lait maternel (2). Les tests sont plus souvent faits dans le sang, car il est possible d'obtenir ces échantillons chez la plupart des groupes d'individus d'une population, que les concentrations sont généralement au-dessus des limites de détection analytiques, et qu'il est généralement admis que les concentrations reflètent l'exposition durant les quelques années précédant la collecte d'échantillon. Par contre, les mesures sanguines ne montrent pas la quantité totale à laquelle une personne a été exposée dans sa vie ni les probabilités d'effets néfastes (2). De plus, il est difficile d'obtenir des échantillons de sang chez les jeunes enfants, sans mentionner que plusieurs échantillons peuvent être nécessaires pour caractériser le profil d'exposition chez ceux-ci puisque plusieurs processus peuvent faire varier les concentrations sanguines rapidement (p. ex. allaitement,

dilution de la charge corporelle pendant la croissance). Des outils sont donc nécessaires pour estimer l'exposition chez les jeunes enfants.

## **Modélisation**

### **La modélisation toxicocinétique**

La modélisation toxicocinétique est une approche mathématique visant l'estimation des concentrations internes d'un composé (p. ex. contaminants ou médicaments) pour un scénario d'exposition. En modélisation toxicocinétique/pharmacocinétique à base physiologique (PBPK), le corps est représenté sous forme de compartiments représentant divers organes ou groupes d'organes reliés par le système circulatoire. Les paramètres physicochimiques et biologiques du xénobiotique étudié et du corps sont pris en compte afin d'estimer le comportement de la substance au sein d'un compartiment spécifique (83, 84). Les équations de pharmacocinétique permettent de considérer des caractéristiques spécifiques telles que l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination en se basant sur des paramètres comme le débit sanguin, le volume des compartiments, la composition tissulaire, etc. Cette technique est fréquemment utilisée dans l'industrie pharmaceutique (83). En épidémiologie, la modélisation nous permet de générer des profils d'exposition de contaminants environnementaux et d'évaluer les risques pour la santé humaine (85, 86). Cette méthode a de nombreux avantages : elle permet d'évaluer différentes voies et intensités d'exposition et de considérer des facteurs temporels comme la croissance, les concentrations lipidiques dans le lait maternel changeantes dans le temps, etc. (87). De plus, la modélisation toxicocinétique est moins coûteuse, représente moins de temps et ne se heurte pas aux mêmes considérations éthiques que des échantillonnages répétés sur une clientèle juvénile (88). Par exemple, ces modèles permettent d'estimer les concentrations de contaminants (p. ex. le DDT) chez les populations vulnérables comme les enfants, ce qui pave la voie pour l'évaluation des associations entre exposition et effets néfastes sur la santé dans le cadre d'études épidémiologiques (87). Cette méthode permet aussi d'étendre la période d'exposition à l'étude ou de cibler des périodes d'exposition développementales spécifiques (87, 88). Le désavantage de la modélisation est que la précision des estimations dépend de nos connaissances sur les propriétés physicochimiques



des xénobiotiques et de la physiologie, mais également de la variabilité interindividuelle dans ces paramètres (83).

## **La modélisation toxicocinétique du transfert mère-enfant**

De sa conception à ses premières années de vie, l'enfant est exposé à de nombreux contaminants par transfert mère-enfant, des échanges qui ont lieu tout d'abord par le placenta et le cordon ombilical et ensuite, par le lait maternel. Cette période est aussi un moment de grands changements physiologiques, tant chez l'enfant que chez la mère. Puisque le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE sont hautement lipophiles et sont distribués majoritairement dans les lipides, le modèle toxicocinétique permettant de simuler les transferts mère-enfant peut se limiter à deux compartiments représentant les lipides de la mère et ceux de l'enfant. La source d'exposition principale de la mère est par l'alimentation, en particulier par la consommation de viandes grasses et de poissons. Les caractéristiques maternelles à considérer sont l'âge, le poids, la prise de poids pendant la grossesse, la durée d'allaitement ainsi que la composition du lait en lipides, la parité et le niveau d'exposition. Ces données, en plus des données physicochimiques des substances à l'étude, comme la demi-vie, et le sexe de l'enfant, permettent d'estimer la dose à laquelle ce dernier est exposé par l'allaitement (87, 89). La biodisponibilité est assumée être 100% ; c'est-à-dire que *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE seraient totalement absorbés par les intestins (90) et distribués uniformément dans les lipides (1). La modélisation toxicocinétique permet de représenter l'exposition de l'enfant à ces contaminants sous forme de concentration dans les lipides, ou d'aire sous la courbe (area under the curve [AUC]) en fonction du temps. De telles estimations de l'exposition de l'enfant peuvent ensuite être utilisées pour vérifier la présence d'associations avec diverses mesures de santé. Cette approche a été utilisée dans le cadre de plusieurs études épidémiologiques, permettant de mettre en lumière certaines associations qui n'auraient pu être observées autrement (85, 86, 91-94).

## **Problématique**

Bien que le DDT soit banni dans la plupart des pays depuis les années 70 à 90 et qu'il soit sévèrement restreint dans les pays qui l'utilisent toujours, ce composé et ses métabolites sont toujours présents dans l'environnement et sont mesurables chez les

humains (39). Ces contaminants sont bioamplifiables, bioaccumulables et peuvent voyager sur de longues distances (3). Le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE sont emmagasinés dans les lipides corporels et sont libérés dans la circulation sanguine en petite quantité tout au long de la vie (40). Ils subissent une libération plus importante lors de la mobilisation des lipides pour l'allaitement, processus pendant lequel la femme se débarrasse d'une partie de sa charge corporelle (25, 95). Ce qui joue le rôle de voie d'élimination pour la mère devient une voie d'exposition pour le nouveau-né et le jeune enfant allaité.

Il devient essentiel de pouvoir quantifier cette exposition à travers le temps afin de pouvoir en évaluer l'impact sur la santé à long terme. Des études *in vivo*, *in vitro* et épidémiologique sur l'exposition au *p,p'*-DDT et au *p,p'*-DDE ont observé des associations avec des modifications du métabolisme et de l'IMC, classifiant ces substances comme obésogènes possibles pour l'humain (96). La plupart des études sur le sujet portent sur l'exposition prénatale; les effets de l'exposition par le lait maternel sur l'IMC des enfants restent peu connus. Les résultats peu concluants des études existantes (29, 67) peuvent être expliqués par le fait qu'un seul échantillonnage du lait maternel ne prenne pas en compte les changements physiologiques et la pharmacocinétique particulière des premiers mois de vie et des nombreux facteurs qui l'influencent. La modélisation toxicocinétique est une solution potentielle à cette problématique.

## **Objectifs de recherche**

Les objectifs de ce projet de recherche étaient 1) d'estimer l'exposition des enfants japonais au *p,p'*-DDT et au *p,p'*-DDE pendant leurs deux premières années de vie à l'aide de la modélisation toxicocinétique et 2) d'évaluer les associations entre cette exposition et le score z d'IMC à 42 mois. Les données utilisées proviennent d'une étude pilote de l'étude de cohorte Japan Environment and Children's Study (JECS).

# Méthode

## Description de l'étude

La Japan Environment and Children's Study (JECS) est une étude de cohorte de grande ampleur composée d'environ 100 000 paires mère-enfant de 15 régions du Japon. Cette étude, lancée par le Ministère de l'Environnement en 2011, a pour but de comprendre comment l'environnement influence la santé des enfants afin de favoriser un développement sain. Cinq études pilotes ont été initiées afin de tester les protocoles et procédures de la JECS. La *Tohoku Study of Child Development* (TSCD), une étude de cohorte prospective au départ indépendante, est devenue la première étude pilote de la JECS. Son objectif était d'évaluer les risques de la consommation de poissons et fruits de mer pendant la grossesse sur la santé de l'enfant (97). Les données utilisées dans le cadre de notre étude proviennent de la cohorte urbaine de la TSCD.

## Participants

Les femmes enceintes ont été recrutées par leurs professionnels de la santé dans deux hôpitaux de la région de Sendai, au Japon. Celles-ci ont donné leur consentement libre et éclairé. Seuls les enfants nés en santé à terme (36 à 42 semaines de gestation) suivant une grossesse sans anomalies ni complications ont été sélectionnés (98).

Les critères d'inclusion relatifs à la mère étaient :

- 1) l'absence de maladie grave qui peut affecter le développement normal du fœtus;
- 2) l'absence de prééclampsie et de diabète gestationnel sévère;
- 3) pas de fertilisation *in vitro*;
- 4) la langue maternelle est le japonais;
- 5) le consentement écrit a été donné.

Les critères d'inclusion relatifs à l'enfant étaient :

- 1) l'absence d'anomalies congénitales ou de maladies graves;

- 2) enfant unique, c'est-à-dire sans jumeau, né à terme;
- 3) poids de naissance supérieur à 2400 g ou supérieur à 2500 g si l'âge gestationnel à la naissance est entre 36 et 37 semaines.

Des 1500 femmes approchées à 22 semaines de gestation entre janvier 2001 et septembre 2003, 687 femmes ont accepté de participer à l'étude (taux de participation de 45,8 %). Pendant leur grossesse, 88 femmes ont dû se retirer en raison du non-respect des critères d'inclusion, laissant 599 paires mère-enfant participantes à l'étude. Les données d'exposition et de mesures de santé nécessaires à la réalisation de notre étude étaient disponibles chez 290 de ces paires.

## **Collecte des données**

Le lait maternel a été collecté un mois après la naissance de l'enfant. Ce sont les mères qui ont envoyé les échantillons aux chercheurs. Le poids de naissance et la grandeur des nouveau-nés ont été recueillis dans à partir des dossiers médicaux. Des questionnaires ont été administrés quatre jours après la naissance pour collecter des informations sur les habitudes de vie, les données démographiques, l'historique médical et la consommation de poisson (98). Les données anthropométriques ont été recueillies par des professionnels qualifiés à différents moments pendant le suivi. Seules les données mesurées à 42 mois étaient disponibles pour un grand nombre d'enfants. La durée d'allaitement a été évaluée lors des rendez-vous de suivi.

Les données nécessaires à notre étude nous ont été fournies par nos collègues au *National Institute for Environmental Studies* (NIES), au Japon.

## **Traitement et analyse des échantillons**

Les échantillons de lait maternel ont été traités et analysés par IDEA Consultants Inc., un laboratoire à Tokyo.

## **Traitement du lait maternel**

Les participantes ont fourni un échantillon de lait maternel un mois après leur accouchement. L'échantillon devait avoir un volume de plus de 50 ml et être collecté dans

les bouteilles en verre propres remises préalablement. Les échantillons ont ensuite été versés dans des tubes à centrifugation de 10 ml et furent immédiatement congelés jusqu'à l'analyse (98). Un échantillon de 5 ml de lait maternel a été mélangé avec 2 ml de sulfate d'ammonium oxalate saturé, 20 ml de 1 : 1 (v :v) éthanol/hexane et 10 ml d'éther diéthylique (99). Le mélange a ensuite été brassé pour 30 minutes. Après la séparation de la première couche d'hexane, le résidu a été extrait à deux reprises avec l'hexane et rincé avec une solution de NaCl 5 %. La couche d'hexane fut ensuite déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre, concentrée et pesée, ce qui permit de quantifier les lipides contenus dans l'échantillon (99). L'extrait fut dilué à nouveau, séparé et divisé en deux fractions. La procédure est détaillée dans l'article de Kanazawa et coll. (99).

### **Quantification des biomarqueurs d'exposition**

L'extrait de lipides obtenu par la procédure précédente a été purifié par chromatographie sur colonne, et le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE ont été mesurés par spectrométrie de masse haute résolution (HRGC/HRMS) (99). Les limites de détection de cette méthode (30 pg/g de lipide pour le *p,p'*-DDT et 10 pg/g de lipide pour le *p,p'*-DDE) ont été calculées selon la méthode établie par Currie et coll. (100). Le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE ont été détectés dans tous les échantillons.

### **Expression des concentrations dans le lait maternel sur base lipidique**

Les niveaux de *p,p'*-DDT et de *p,p'*-DDE mesurés dans les échantillons de lait maternel ont été exprimés en ng/g de lipides. Les approches les plus communes par rapport à l'ajustement des lipides sont d'exprimer les concentrations sur base lipidique, d'inclure la composition en lipides de la matrice comme covariable dans le modèle de régression linéaire, ou d'utiliser les concentrations non ajustées en poids humide dans les analyses épidémiologiques (96). Il n'y a pas de consensus sur la meilleure approche dans le cadre de situations complexes (96), comme celle qui fait l'objet de notre étude. Nous avons donc décidé de suivre la première approche, étant donné que notre modèle toxicocinétique nécessite les concentrations sur base lipidique.

## Analyse toxicocinétique

Le modèle toxicocinétique utilisé a été mis au point et validé dans deux cohortes de naissances par Verner et coll. (1). Les substances qui ont un coefficient de partage log n-octanol : eau supérieur à quatre sont considérés comme hautement lipophiles (38). On peut supposer que leur absorption dans les tissus non lipidiques est négligeable (101). C'est le cas du *p,p'*-DDT et du *p,p'*-DDE, qui ont des coefficients de partage de 6,91 (9) et 6,51 (102), respectivement. C'est ce qui nous permet d'avoir un modèle à deux compartiments; un pour les lipides corporels maternels et un pour ceux du fœtus/de l'enfant.

L'exposition chez la mère se fait par l'alimentation. Le fœtus est exposé par le transfert placentaire et le nouveau-né, par le lait maternel. Nous supposons que le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE sont totalement absorbés par le tractus gastro-intestinal et uniformément distribués dans les lipides maternels et fœtaux (38). La croissance du fœtus et de l'enfant est calculée en utilisant des courbes de croissances (103). Nous considérons que la différence entre le poids maternel après l'accouchement et le poids avant la grossesse est composée à 75 % de lipides (1). Le métabolisme et l'excrétion se font par biotransformation et par excrétion fécale pour la mère et l'enfant. La mère excrète aussi ces substances dans son lait maternel. L'exposition de l'enfant par cette voie est calculée en fonction de sa consommation en lait, de la teneur en lipides de ce dernier, et de la concentration de *p,p'*-DDT ou *p,p'*-DDE dans les lipides de la mère. Le taux d'élimination est calculé à partir de la demi-vie biologique des composés, soit 5 ans pour le *p,p'*-DDT (39) et 13 ans pour le *p,p'*-DDE (18). La consommation de lait est calculée en fonction de l'âge de l'enfant et de son poids selon les équations découlant d'études (104, 105).

Apport horaire en lait maternel de 0 à 12 mois :

$$\text{Apport LM}(\frac{L}{kg} \text{ poids corporel}) = -0.0024 \times \text{Age(années)} + 0,0063$$

Apport horaire en lait maternel de 12 à 24 mois :

$$\text{Apport LM}(L) = -0,0086 \times \text{Age(années)} + 0,0188$$

Où :

- Le poids corporel est celui de l'enfant selon les courbes normales en kg

- L'âge est celui de l'enfant en années

Teneur en lipides dans le lait maternel :

$$Teneur\ lipides\ LM\ \left(\frac{kg}{L}\right) = 0,0034 \times \ln(age[années]) + 0,0414$$

Où :

- L'âge est celui de l'enfant en années

Nous avons utilisé le logiciel AsclX pour rouler nos simulations pour chacune des paires mère-enfant. Nous avons tout d'abord obtenu la dose d'exposition orale quotidienne de la mère en procédant à des simulations itératives jusqu'à ce que la concentration estimée dans le lait maternel soit la même que la concentration mesurée dans l'étude. Cette dose nous a permis de calculer les niveaux de contaminants dans les compartiments de notre modèle et donc d'estimer les concentrations de *p,p'*-DDT et de *p,p'*-DDE dans les lipides de l'enfant. Nous avons ainsi obtenu les niveaux d'exposition pour chaque paire mère-enfant. Les profils temporels modélisés nous ont par la suite permis de calculer l'AUC pour trois périodes d'intérêt, c'est-à-dire les 6 premiers mois, de 6 à 12 mois et de 12 à 24 mois. Les AUC ont été calculées à l'aide de l'algorithme d'intégration CVODE (106).

## Considérations éthiques

Les participantes ont reçu toute l'information nécessaire afin de donner leur consentement écrit, libre et éclairé. Les informations ont été récoltées lors de rencontres en personne par les coordonnateurs de recherche des centres régionaux qui ont suivi une formation obligatoire. Ces employés sont des professionnels de la santé (infirmière, médecins, etc.) qui ont une obligation légale de confidentialité et qui ont signé un contrat de non-dévoilement des informations. Les informations données ont couvert, entre autres, le but de l'étude, la méthode, l'éligibilité pour la participation, la durée de l'étude, les bénéfices et risques potentiels, la confidentialité et l'utilisation des données. Les participantes peuvent retirer leur consentement en tout temps. Dans ce cas, leurs questionnaires et données cliniques et biochimiques seront détruits. Elles seront informées par écrit dès que la procédure est complétée.

Le protocole principal de la JECS a été révisé et approuvé par le comité d'éthique du Ministère de l'Environnement au Japon et par le *Ethical Committee for Medical Studies* au NIES. La TSCD a aussi été approuvée par le comité d'éthique de la *Tohoku University Graduate School of Medicine*. Le protocole de notre étude a été approuvé par le Comité d'éthique de la recherche en santé de l'Université de Montréal (voir Annexe 3).



# Article

## Contribution des auteurs

Laurence Plouffe :

- A travaillé en collaboration avec son directeur de maîtrise, Marc-André Verner afin de mettre au point un protocole de recherche et les documents nécessaires à sa réalisation;
- a participé à la rédaction de la demande d’approbation éthique;
- a géré toutes les étapes suivant l’obtention des données;
- a fait le lien entre les chercheurs du *National Institute for Environmental Studies* (Tsukuba, Japon) et le laboratoire de Marc-André Verner afin de pouvoir utiliser leurs données dans le cadre de l’étude;
- a travaillé sur le modèle toxicocinétique utilisé dans le cadre de la présente étude;
- a fait un séjour de recherche au sein du *National Institute for Environmental Studies* et a travaillé en étroite collaboration avec Shoji F. Nakayama, qui est à la tête du Center for Health and Environmental Risk Research (Exposure Dynamics Research Section);
- a travaillé en étroite collaboration avec Lina Madaniyazi à la réalisation des premières étapes d’analyses statistiques, puis avec Delphine Rieutort pour les étapes finales des analyses;
- a rédigé l’intégralité de l’article et y a apporté les corrections jugées nécessaires par son directeur de recherche et ses coauteurs.

Delphine Rieutort :

- A travaillé en étroite collaboration avec Laurence Plouffe à la finalisation des dernières étapes du protocole d’analyse à l’aide du logiciel R;
- a donné son avis sur les meilleurs types d’analyse de données;

- a aidé à la mise en page de tableaux de résultats avec le logiciel R.

Lina Madaniyazi :

- A travaillé en étroite collaboration avec Laurence Plouffe à la réalisation des premières étapes du protocole d'analyse;
- a mis à profit son expertise en analyses de données et en statistiques afin de nettoyer le jeu de données;
- a conseillé Laurence Plouffe par rapport aux meilleures pratiques d'analyse de données.

Miyuki Iwai-Shimada :

- A géré la base de données localisée au National Institute for Environmental Studies;
- a fourni les documents et explications nécessaires à la réalisation de l'étude et à la rédaction du manuscrit;
- a produit les jeux de données et les tableaux nécessaires à la réalisation de l'étude et à la rédaction du manuscrit.

Kunihiko Nakai :

- A mené la sous-étude initiale dans le cadre de la JECS à l'Université de Tohoku, au Japon, et nous a partagé les données nécessaires à la réalisation de notre étude.

Nozomi Tatsuta :

- A contribué au développement du protocole de l'étude pour l'évaluation du développement neurocomportemental et a procédé à la collecte de données anthropométriques et psychologiques.

Shoji F. Nakayama :

- A encadré Laurence Plouffe pendant son séjour de recherche au sein de son laboratoire;

- a collaboré avec Laurence Plouffe et Marc-André Verner pendant toutes les étapes de la réalisation de la présente étude;
- a fourni les documents et explications nécessaires à la réalisation de l'étude et à la rédaction du manuscrit.

Marc-André Verner :

- A conçu le modèle toxicocinétique utilisé dans la présente étude;
- a travaillé en étroite collaboration avec Laurence Plouffe afin de mettre au point le protocole de recherche et les documents nécessaires à la réalisation de l'étude;
- a supervisé Laurence Plouffe pendant sa maîtrise, a suivi de près sa progression et s'est impliqué dans toutes les étapes de son parcours;
- a travaillé sur l'analyse des données et sur leur interprétation en collaboration avec Laurence Plouffe;
- a contribué à la rédaction du manuscrit et à la révision de diverses versions en collaboration avec Laurence Plouffe.

# **Estimated postnatal p,p'-DDT and p,p'-DDE levels in Japanese children and body mass index at 42 months of age**

Laurence Plouffe<sup>a,b</sup>, Delphine Rieutort<sup>c,d</sup>, Lina Madaniyazi<sup>e,f</sup>, Miyuki Iwai-Shimada<sup>e</sup>, Kunihiro Nakai<sup>e</sup>, Nozomi Tatsuta<sup>g</sup>, Shoji F. Nakayama<sup>e</sup>, Marc-André Verner<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>b</sup> Université de Montréal Public Health Research Institute (IRSPUM), Montreal, Quebec, Canada

<sup>c</sup> Department of Chemical and Biological Risks Prevention, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité au travail (IRSST), Montréal, Québec, Canada

<sup>d</sup> Centre de recherche du CHUM (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada

<sup>e</sup> Center for Health and Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki 305-0053, Japan

<sup>f</sup> Department of Pediatric Infectious Disease, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

<sup>g</sup> Department of Development and Environmental Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Miyagi, Japan

Correspondence to:

Marc-André Verner

Department of Environmental and Occupational Health (DSEST)

Université de Montréal Public Health Research Institute (IRSPUM)

School of Public Health (ESPUM)

Université de Montréal

## Abstract

Children are exposed to *p,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane (*p,p'*-DDT) and *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE) through placental and lactational transfer. Studies have revealed that these exposures could lead to increased body mass index (BMI) during childhood. Our aim was to assess whether exposure through breast milk is associated with BMI in Japanese children at 42 months of age. We used data from a pilot study (n=290) of the Japanese Environment and Children Study (JECS). *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE levels were measured in breast milk, and levels in children were estimated using a toxicokinetic model for three exposure periods (0-6 months, 6-12 months, 12-24 months). Associations with BMI at 42 months of age were assessed using multivariate linear regression models. Our study revealed no significant association with levels of *p,p'*-DDT measured in breast milk or estimated in children. Positive associations with *p,p'*-DDE were found in girls during all exposure periods. For each log increase in the estimated *p,p'*-DDE levels, BMI z-score increased by 0.23 (C.I. 95%: 0.01, 0.45) for the 0-6 months exposure period, 0.26 (C.I. 95%: 0.06, 0.47) for the 6-12 months exposure period and 0.24 (C.I. 95%: 0.05, 0.43) for the 12-24 months exposure period. Our results for girls were similar to those found in a previous meta-analysis that included boys and girls (BMI z-score increase of 0.13 by log increase in prenatal *p,p'*-DDE levels), supporting that early-life exposure to *p,p'*-DDE may be associated with higher BMI during childhood.

### Highlights:

**Keywords :** dichlorodiphenyltrichloroethane, dichlorodiphenyldichloroethylene, persistent organic pollutants, body-mass index, BMI, postnatal exposure, breast milk, toxicokinetic modeling

## Introduction

*p,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane (*p,p'*-DDT) has mainly been used as an insecticide in agricultural crops. Although it was banned in most countries decades ago, it is still used in some countries for malaria vector control (2). *p,p'*-DDT and its metabolites, such as *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE), are widespread in the environment (3). They are persistent, they bioaccumulate in fatty tissues of exposed organisms and are magnified through the food chain. Both of these chemicals have been measured in human tissues like breast milk (4, 5).

Children are exposed to *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE through placental transfer and breastfeeding (6-8). Because of their long biological half-lives and their lipophilic nature, *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE accumulate in the mother's adipose tissues (9). Because these chemicals can partition into breast milk lipids, breastfeeding is a major excretion route for the mother and a substantial exposure route for the child (10). In most countries, adults' exposure to *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE mainly comes from diet (11). They are found in fatty foods such as red meat, poultry and eggs, dairy products and fish (10), the latter taking an important place in the Japanese diet. This could have an impact on Japanese children's exposure, which occurs during a critical period for child development.

A systematic review and meta-analysis conducted by Cano-Sancho et al. (12) gathered epidemiological, *in vivo* and *in vitro* studies on the association between *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE and obesity. *In vitro* studies have shown that *p,p'*-DDT can impair adipose tissue homeostasis and induce endocrinal disruptions; results on *p,p'*-DDE were inconsistent. The *in vivo* studies found that perinatal exposure to *p,p'*-DDT can induce thermogenesis and lipid metabolism disruptions, especially in female offspring (13), and transgenerational obesity (14). Most epidemiological data collected in this review focused on the prenatal exposure. The meta-analysis of seven selected human studies revealed a significant positive association between *p,p'*-DDE exposures and higher BMI z-scores. Associations with other weight-related outcomes were less consistently reported, like associations between *p,p'*-DDT and BMI z-scores. The authors expressed the need for more epidemiological and experimental studies, and classified these contaminants as "presumed" human obesogens.

Because most epidemiological studies on the association of *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE with children's weight focused on prenatal exposure, little is known about the potential impacts of exposure through breast milk. We only identified three studies on lactational exposure to *p,p'*-DDE and children's weight (4, 15, 16). Two out of three studies used approaches that do not account for the complexity of early-life pharmacokinetics, which are influenced by many factors such as child growth, breast milk content, and breastfeeding duration. Du et al. (4) used breast milk levels at 2, 5, 9 and 12 months in 16 mothers to estimate children's exposure. They found no association between breast milk levels and infant growth and development measures at 12 months of age. Pan and al. (15) measured breast milk levels once at three months and multiplied this concentration with the breastfeeding duration to estimate children's lactational exposure. They too found no association between lactational exposure and infant growth at 12 months of age. As an alternative approach to assess lactational exposure, toxicokinetic modeling can be used to estimate children's levels during and after lactation, countering the methodological limits seen in the Du et al. (4) and Pan and al. (15) studies. Such models have been developed (1, 17-19) to estimate children's levels during infancy/childhood, allowing the assessment of associations between exposure during hypothesized windows of vulnerability and various health outcomes. Iszatt et al. (16) used this approach to estimate prenatal and postnatal cumulative exposures to *p,p'*-DDE in seven European birth cohorts. They found an association between prenatal *p,p'*-DDE exposure and increased infant growth, but no association with postnatal exposure estimates. Given the limitations of previous studies and the paucity of data the association between lactational exposure to *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE and children's weight, further investigation is warranted.

The aim of our study was to evaluate the association between measured breast milk levels and estimated children's postnatal levels of *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE, and BMI z-score in 42-month-olds participating in the Tohoku Study of Child Development (Japan). Because no postnatal exposure assessment was conducted in this study, we used a validated toxicokinetic model to estimate children's levels throughout their first two years of life.

## Materials and Methods

### Study participants

The Japan Environment and Children's Study (JECS) is a cohort study taking place across fifteen regions of Japan. It includes more than 100 000 mother and child pairs. The aim of this research is to study associations between children's exposure to various environmental factors and health outcomes. Five pilot studies were created in order to test the protocols and procedures of the JECS. The first one is the *Tohoku Study of Child Development* (TSCD), which was an independent prospective cohort study that became part of the JECS. Its goal was to evaluate the risks associated with seafood consumption during pregnancy (20).

Pregnant women were recruited through their obstetrical units in two hospitals in the Sendai region (20). Women were eligible if 1) they did not have any serious illnesses that could impair the fetus' development; 2) they did not suffer from pre-eclampsia or gestational diabetes mellitus; 3) *in vitro* fertilization wasn't used; 4) their native language was Japanese; 5) they gave their written consent. Children's inclusion criteria were 1) the absence of congenital anomalies or serious illnesses; 2) singleton birth, born after 36 weeks of gestation; 3) birth weight more than 2 400 g, or higher than 2 500 g if gestational age at birth was between 36 and 37 weeks.

Of the 1 500 recruited women who were met between January 2011 and September 2003, 687 gave their consent to participate to the study (participation rate: 45.8 %). During their pregnancies, 88 women had to withdraw from the study, either because their baby did not meet the inclusion criteria (n=54), because of a move in another region (n=18), or because they dropped out or weren't reachable (n=16) (20, 21). This narrowed the final number of participants to 599. We then selected the participants who had their breast milk tested for *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE, had data on total breastfeeding duration (highly influential parameter in the toxicokinetic model), and had data on child weight and height at 42 months (used to calculate BMI, the health outcome of this study), leaving 290 mother-child pairs.



The JECS protocol was approved by the Ministry of Environment Ethics Committee and the Ethical Committee for Medical Studies within the National Institute for Environmental Sciences (NIES). The TSCD was also approved by the Tohoku University Graduate School of Medicine ethics committee (20). In addition, the protocol for the analyses presented in this paper was approved by the Université de Montréal Institutional Review Board.

## **Data Collection**

Mother's breast milk was collected one month after delivery. Birth weight and length were transcribed from the medical records. Data on demographics, lifestyle, medical history, and fish consumption was obtained through questionnaires administered four days after delivery (21). Breastfeeding duration and anthropometric data such as children's weight and height were assessed at the 7, 18, 30 and 42 months checkups by trained physicians. Information on breastfeeding duration was collected through questionnaires. Only anthropometric measurements at 42 months were carried out on a large number of children.

## **Chemical Analysis**

Mothers were asked to send a breast milk sample of more than 50 ml in a clean glass bottle one month after delivery. Samples were aliquoted in 10 ml centrifuge tubes and immediately frozen until analyses.

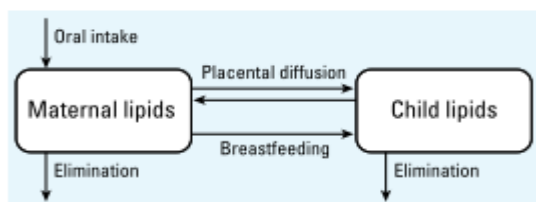
All manipulations were made by IDEA Consultants, Inc. laboratory in Tokyo (21). A sample of 5 ml of breast milk was mixed with 2 ml of saturated sodium oxalate, 20 ml of 1:1 v/v ethanol/hexane and 10 ml of diethyl ether. The first hexane layer was mixed for 30 minutes, separated and the residue was extracted twice with hexane. The hexane layer was then dehydrated using anhydrous sodium sulfate and evaporated. The lipid extract was weighted, dissolved in hexane and purified using Florisil cartridge column chromatography (22). Pesticides were then measured using a gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (HRGS/HRMS) system. The quality control was performed in accordance with the German external quality assessment scheme (G-EQUAS). The method limit of

detection (30 pg/g-lipid for  $p,p'$ -DDT and 10 pg/g-lipid for  $p,p'$ -DDE) was calculated using Currie et al.'s method (23). Because our toxicokinetic model uses levels in lipids, we expressed concentrations in ng/g-lipid.

## Toxicokinetic model

We used the toxicokinetic model of prenatal and lactational exposure to lipophilic persistent organic pollutants (including  $p,p'$ -DDT and  $p,p'$ -DDE) developed by Verner et al. (1) to estimate children's levels. It has two compartments: one for the mother's lipids and one for the child's lipids. The mother is exposed through diet and the child is exposed *in utero* through the placenta, and postnatally through breastfeeding (Figure 1). The model assumes that lipophilic persistent organic pollutants are completely absorbed through the gastrointestinal tract and distribute evenly in lipids (1). The percentage of lipids in fetal

Figure 2. Conceptual representation of the pharmacokinetic model



Verner, Sonneborn (1), Reproduced from *Environmental Health Perspectives*.

tissues was set to values at birth and fetal and child growth was calculated using growth curves (24). The increase in maternal body fat mass during pregnancy was calculated as the difference between weight gain and increase in lean tissues. After delivery, the difference between prepregnancy weight and actual weight was attributed only to adipose tissue, which was assumed to be composed of 75% lipids (1). Elimination rates were based on half-lives [ $p,p'$ -DDT:  $\approx$  5 years (25) and  $p,p'$ -DDE: 13 years (26)]. Exposure through breast milk was calculated based on children's milk consumption and milk lipid content. We generated profiles of maternal, breast milk and children's  $p,p'$ -DDT and  $p,p'$ -DDE levels for each participating mother-child pair. For each pair, the model incorporated individual-specific data on mother's age at delivery, the total breastfeeding duration, mother's body weight before pregnancy and one month after delivery, weight gain during pregnancy, and child's sex. For each pair and each chemical, iterative model simulations were performed to obtain a maternal lifetime daily oral intake leading to an estimated breast milk matching the measured breast milk level. This dose was then used in the model to estimate children's areas under the concentration vs. time curves (AUCs) for three periods: 0 to 6 months, 6 to

12 months, and 12 to 24 months of age. Average children's levels during these periods were calculated by dividing AUCs by the integration period.

## **Statistical Analysis**

11.24% of the weight gain during pregnancy data and 26.4% of the weights one month after delivery data was missing. Missing data was due to non-response to the questionnaires. We tested the Missing at random assumption with t-tests for numeric variables, chi-squared test for categorical variables and an overall test of randomness (Little's MCAR test). Most results for t-tests showed statistical significance ( $p$ -value  $< 0.05$ ) but most of the chi-squared tests did not. Little's MCAR test showed statistical significance. Thus, we concluded that the missing data was not missing completely at random (MCAR), but was missing at random (MAR). Missing data related to the mothers' body weight was imputed using the MICE multiple imputation package in R with predictive mean matching (pmm) and we set the number of imputed datasets to 100 ( $m=100$ ). Toxicokinetic model simulations were performed for each mother-child pair and for each of the imputed datasets.

The covariates were selected using the directed acyclic graphs (DAGs) method, which is an approach that reduces the degree of bias that can occur when measuring causal relationships between exposure and effect (27). Covariates included total breastfeeding duration (months, continuous), infant's sex, weight gain during pregnancy, prepregnancy BMI, and fish intake (g/year; continuous). Available information did not allow estimating the duration of exclusive breastfeeding. For that reason, only the total duration of breastfeeding was used, and daily breast milk intake was based on equations derived from studies including exclusively and partially breastfed children. The hourly breast milk intake for the first year of life was calculated using a formula based on data from Arcus-Arth et al. (28), and from Kent et al. (29) for the second year of life.

We calculated sex and age-specific BMI z-scores using the World Health Organization's growth charts, which is an international standard taking into account children from different ethnic and cultural backgrounds (30). Summary statistics were computed for study outcome, exposures and covariates of interest. We performed

correlation analyses to evaluate the relationship between measured and estimated exposure metrics. Multiple linear regression analyses were performed to examine the relation between exposure metrics (i.e., breast milk levels, average estimated children's levels for the 0-6, 6-12, and 12-24 months periods) and BMI z-scores at 42 months of age. Exposure metrics were ln-transformed prior to regression analyses. All potential covariates identified in the DAG were kept in the regression models if they were correlated with the BMI z-scores and exposure metrics with a  $p$ -value  $< 0.2$  (Model 1). We ran sensitivity analyses stratifying by sex, and we ran a second model adjusted for all or potential confounders (Model 2). We then looked at variance inflation factors (VIFs) to assess multicollinearity and verified that the residual plots did not display unwanted patterns. Analyses were performed in R, version 1.1.456.

## Results

### Participant characteristics

Table 1 presents the participants' characteristics. The median maternal age at delivery was 31 (range: 20-41) years, and the median total breastfeeding duration was 1.4 (range: 0.1-4) years. Forty-four percent of the women obtained a college or vocational school degree and 32% of them obtained a university degree. When missing, gestational weight gain and maternal body weight after pregnancy were imputed. The medians were similar in both the original and imputed datasets. Before pregnancy, 11% of the mothers were underweight, 85% were normal weight, 4% were overweight and 1% were obese according to the WHO BMI categories (31). Excluded mother-child dyads ( $n=243$ ) tended to have a slightly higher maternal prepregnancy body weight and child birth weight. They also tended to smoke more than the included women. The amount of missing data on ingested energy, on family income and on  $p,p'$ -DDT concentrations in breast milk in the excluded group makes us unable to assess the difference between the two groups in these regards.

Table 1. Characteristics of study participants.

Variable	n (%)	Median (range)
Child characteristics		
Sex		
Male	156 (54)	
Female	134 (46)	
Gestational age (weeks)	290 (100)	39.6 (36.1, 41.9)
Birth weight (kg)	290 (100)	3.02 (2.2, 4.2)
42 month examination		
Weight (kg)	290 (100)	15 (11.1, 20.2)
Height (cm)	290 (100)	96.6 (88.7, 104.5)
BMI	290 (100)	16.12 (13, 19.9)
BMI z-score	290 (100)	0.5 (-2, 3)
Maternal characteristics		
Age at delivery (years)	290 (100)	31 (20, 41)
Height (cm)	290 (100)	158 (147, 173)
Weight (kg, prepregnancy)	290 (100)	52 (40.5, 81)
BMI (pregnancy)	290 (100)	20.8 (16.2, 33.5)
Weight (kg, postpartum)	216 (75)	54.5 (42, 83)
Weight gain during pregnancy (kg)	258 (89)	9.3 (-1.4, 21)
Total breastfeeding duration (years)	290 (100)	1.4 (0.1, 4)
Education		
High school	70 (24)	
College	127 (44)	
University	92 (32)	
Unknown	1 (0)	
Fish intake (g/year)	290 (100)	21 977 (0, 112 603)

## Measured and estimated exposure metrics

Table 2 shows measured breast milk and estimated children's levels. *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE were detected in all breast milk samples. The estimated children's concentrations for the three time windows (0-6 months, 6-12 months and 12-24 months) were estimated using the toxicokinetic model previously presented.

Table 2. Measured breast milk and estimated children's concentrations (ng/g-lipid) among participating children from birth to 24 months of age (n=290)

POPs	Min	P25	P50	P75	Max
<i>p,p'</i> -DDT					
Breast milk	1.4	4.4	6.3	8.6	34.5
Child 0-6 months	2.4	7.8	10.9	15.4	62.5
Child 6-12 months	3.0	10.7	14.6	21.7	98.9
Child 12-24 months	2.4	10.2	14.8	21.7	110.6
<i>p,p'</i> -DDE					
Breast milk	24.7	86.7	138.5	194.1	658.3
Child 0-6 months	44.4	156.1	247.4	357.5	1228.1
Child 6-12 months	46.44	216.5	349.3	513.3	1934.9
Child 12-24 months	48.0	222.9	370.3	551.6	2261.4

P: percentile

## Associations between *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE and children's BMI z-score

Associations between exposure to *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE through breast milk and BMI z-scores at 42 months are shown in Table 3. Model 1 represents the model adjusted only for maternal prepregnancy BMI, because it was the only covariate that respected our inclusion criteria. Model 2 is adjusted for the variables we identified *a priori* as potential confounders using a DAG. We did not find any significant association with measured breast milk levels. Estimated children's *p,p'*-DDT levels were not significantly associated with higher BMI z-scores in either model. Only one significant association was found with *p,p'*-DDE, with higher BMI z-score for estimated children's levels during the 12-24

months period when including boys and girls. Significant associations were revealed with sex stratification, with *p,p'*-DDE being associated with greater BMI z-score in girls for the three exposure periods in both Model 1 and Model 2. Overall, when significant associations were found, they were slightly stronger in Model 2. Beta coefficients for different time periods were similar, which may be related to the fact that exposure estimates were strongly correlated across periods, with correlation coefficients ranging from 0.84 to 0.98 for *p,p'*-DDT and 0.85 to 0.98 for *p,p'*-DDE (see Supplemental Material). In all regression models, VIF values were below 1.2 and residuals were normally distributed.

Table 3. Associations between measured breast milk or estimated children's *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE and BMI z-score at age 42 months.

BMI z-scores	Model 1 <sup>a</sup>				Model 2 <sup>b</sup>			
	<i>p,p'</i> -DDT (ng/g-lipid)		<i>p,p'</i> -DDE (ng/g-lipid)		(ng/g- <i>p,p'</i> -DDT lipid)		(ng/g- <i>p,p'</i> -DDE (ng/g-lipid)	
	β (95% CI)	p	β (95% CI)	p	β (95% CI)	p	β (95% CI)	p
Measured concentrations								
All children	-0.04 (-0.23, 0.15)	0.706	0.08 (-0.08, 0.24)	0.320	-0.05 (-0.24, 0.14)	0.629	0.07 (-0.09, 0.24)	0.360
Girls <sup>c</sup>	0.11 (-0.15, 0.36)	0.413	0.20 (-0.03, 0.43)	0.085	0.10 (-0.16, 0.35)	0.478	0.20 (-0.02, 0.43)	0.078
Boys <sup>c</sup>	-0.18 (-0.46, 0.09)	0.190	-0.01 (-0.24, 0.21)	0.901	-0.21 (-0.49, 0.07)	0.141	-0.05 (-0.28, 0.18)	0.680
AUC 0-6 months								
All children	-0.02 (-0.21, 0.17)	0.847	0.09 (-0.07, 0.25)	0.252	-0.03 (-0.21, 0.16)	0.790	0.09 (-0.07, 0.25)	0.276
Girls <sup>c</sup>	0.15 (-0.10, 0.40)	0.248	0.23 (0.01, 0.45)	0.044	0.13 (-0.12, 0.38)	0.313	0.23 (0.01, 0.46)	0.042
Boys <sup>c</sup>	-0.19 (-0.47, 0.09)	0.174	-0.02 (-0.24, 0.20)	0.870	-0.21 (-0.49, 0.07)	0.138	-0.05 (-0.28, 0.18)	0.668
AUC 6-12 months								
All children	0.05 (-0.12, 0.23)	0.547	0.14 (-0.01, 0.29)	0.075	0.06 (-0.11, 0.24)	0.480	0.15 (-0.01, 0.30)	0.060
Girls <sup>c</sup>	0.21 (-0.02, 0.47)	0.069	0.26 (0.06, 0.47)	0.011	0.19 (-0.05, 0.43)	0.113	0.28 (0.06, 0.49)	0.012
Boys <sup>c</sup>	-0.12 (-0.38, 0.14)	0.377	0.02 (-0.21, 0.24)	0.871	-0.10 (-0.37, 0.17)	0.454	0.01 (-0.21, 0.24)	0.904
AUC 12-24 months								
All children	0.06 (-0.10, 0.22)	0.474	0.14 (-0.01, 0.28)	0.067	0.09 (-0.08, 0.26)	0.309	0.16 (0.01, 0.32)	0.034



Girls <sup>c</sup>	0.19 (-0.02, 0.39)	0.070 (0.05, 0.43)	0.24 (0.05, 0.43)	0.012 (-0.04, 0.42)	0.19 (-0.04, 0.42)	0.101 (0.06, 0.48)	0.27 (0.06, 0.48)	0.010
Boys <sup>c</sup>	-0.09 (-0.34, 0.15)	0.458 (-0.19, 0.25)	0.03 (-0.19, 0.25)	0.810 (-0.31, 0.21)	-0.05 (-0.31, 0.21)	0.688 (-0.18, 0.27)	0.04 (-0.18, 0.27)	0.702

<sup>a</sup> Adjusted for prepregnancy BMI

<sup>b</sup> Adjusted for prepregnancy BMI, weight gain during pregnancy, fish intake (g/year), and total breastfeeding duration / Exposure variables were ln-transformed

<sup>c</sup> Girls (n=134); boys (n=156)

## Discussion

In this study, we evaluated whether postnatal exposure to *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE is associated with BMI z-score in 42-month-old children from the Tohoku Study of Child Development. We found associations between children's *p,p'*-DDE levels and higher BMI z-scores (mostly in girls), but none with *p,p'*-DDT.

We selected BMI as our outcome as studies have shown that childhood obesity and/or overweight is associated with obesity, cardiometabolic morbidities and cancer in adulthood (32-34). Associations were only observed with *p,p'*-DDE. This difference between chemicals could be due to a stronger obesogenic potential of *p,p'*-DDE than *p,p'*-DDT. However, this could also be due to the fact that measured *p,p'*-DDE levels of this contaminant were higher (possibility of greater analytical accuracy at higher levels), and that toxicokinetic model predictions were more precise and accurate for *p,p'*-DDE than *p,p'*-DDT in this cohort. The mechanism of *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE action on BMI increase remains uncertain. *In vitro* studies suggested that these chemicals may be endocrine disruptors (35) and that they could impair lipid secretion and metabolism (36). In rat models, perinatal exposure to a commercial formulation of DDT can induce thermogenesis and lipid metabolism disruptions, especially in female offspring (13) and could induce transgenerational obesity (14). The difference between sexes could be explained by the impact of *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE on the endocrine system, as the first

is an estrogen and androgen receptor antagonist whereas the latter is an androgen and progesterone antagonist (35). Given the lack of data regarding sex-specific obesogenic mechanisms of *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE, the reasoning behind this phenomenon still remains uncertain.

In this study, we examined associations between estimated *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE levels during different time windows: 0 to 6 months, 6 to 12 months, 12 to 24 months. Since the strength of the associations were similar from one time period to another, we weren't able to identify a specific critical exposure window. This could be interpreted as the lack of a specific window of vulnerability to the obesogenic impacts of these chemicals during the first two years of life. Another explanation could be that the result of exposure metrics, being highly correlated across periods, did not allow distinguishing time-specific differences in strength of exposure-outcome associations.

Our effect estimates for postnatal exposure was slightly stronger than the meta-analytic effect estimate reported by Cano-Sancho et al. (12), but confidence intervals overlapped. All studies except one in the meta-analysis focused on prenatal exposure to *p,p'*-DDE. We found slightly stronger associations in Model 2 and with later exposure periods in general, although the differences were mostly negligible. In the meta-analysis, three studies stratified by sex to examine potential differences between young boys and girls regarding association with obesity indicators. Two of them found stronger associations with boys (37, 38) and one of them, with girls (39). One of the first two studies focused on exposure at eight years of age and weight gain. They noticed an inverse association in the highest exposed girls at 20 to 22 years of age (37). The other study reported a significant association with prenatal exposure to *p,p'*-DDT and higher BMI z-score at nine years of age in boys, but not with *p,p'*-DDE and not in girls (38). The last one found a significant association with prenatal exposure to *p,p'*-DDE and greater waist circumference and weight/height ratio in girls, but not with BMI z-scores (39). Cano-Sancho et al. concluded that no sex-specific trend could be identified with these results.

In the studies included in the meta-analysis, *p,p'*-DDE exposure levels varied, with medians ranging from 1.1 to 2700 ng/g-lipid. In our study, the median of *p,p'*-DDE level in breast milk was 138.5 ng/g-lipid. In most studies, contaminants were measured in

maternal serum during pregnancy, and in children's serum when they were eight to ten years old in one study. In our study, we measured *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE levels in breast milk collected one month after birth. Breast milk levels are highly correlated to maternal serum levels during pregnancy (40, 41), making them a proxy of prenatal exposure. Unfortunately, *p,p'*-DDT wasn't studied as much as *p,p'*-DDE, and the meta-analysis' results didn't include data on this exposure.

Our study has some important strengths. First of all, the longitudinal study design is ideal when evaluating associations between risk factors and developmental outcomes or patterns. Anthropometric data were collected by trained physicians, which reduces measurement error. We were also able to estimate children's exposure to *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE during the first two years of life with our toxicokinetic model. This addresses a frequent limitation in epidemiologic studies related to the difficulties in measuring young children's exposure: measuring these chemicals in a single blood sample cannot account for the early life biological, physiological and pharmacokinetic complex changes. Some limitations are also worth mentioning. First of all, when stratifying by sex, our sample size was cut by more than half, going from 290 to 134 mother-child pairs for analyses in girls. Also, estimations using the toxicokinetic model are not perfectly precise, and the error in level estimates likely impacted the precision in exposure-outcome models. Exclusive breastfeeding duration data wasn't available, which could have potentially helped increase the precision of the estimates. Furthermore, uncertainty in measured breast milk *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDT levels due to analytical measurement error and intra- and inter-feed variability may have impacted precision in exposure estimates. The strength of childhood BMI as a predictor of adult obesity-related morbidities, also remains unclear (34, 42). We also didn't take into account exposure to other environmental contaminants that could induce synergic, antagonistic or additive effects. We cannot exclude the possibility of residual confounding by unmeasured factors. Additionally, our study only included children who were breastfed for a month or more. Participants with missing information essential to our toxicokinetic model, such as breastfeeding duration and outcome measures in children, were excluded, decreasing the generalizability of our results. Finally, correlations between the exposure metrics were very high, making it difficult to detect associations related to a specific exposure period.

## Conclusions

Our study suggested an association between estimated children's *p,p'*-DDE levels and higher BMI z-scores in girls. These results suggest that prenatal exposure may not be the only sensitive time window when looking at chemical exposures and weight-related outcomes later in life. Our exposure levels and the strength of our associations concurred with that of Cano-Sancho et al.'s meta-analysis (12). Postnatal exposure to chemicals should be taken into consideration when establishing strategies against the obesity epidemic and in the risk/benefit calculations of DDT usage in countries fighting malaria.

## Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Marc-André Verner is the recipient of a Research Scholar J1 Award from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS).

Declaration of interest: none.

## References

1. Verner, Sonneborn D, Lancz K, Muckle G, Ayotte P, Dewailly E, et al. Toxicokinetic modeling of persistent organic pollutant levels in blood from birth to 45 months of age in longitudinal birth cohort studies. *Environ Health Perspect.* 2013;121(1):131-7. Epub 2012/10/23.
2. World Health Organization. The use of DDT in malaria vector control. 2011.
3. EPA U. DDT – A Brief History and Status. 2017.
4. Du J, Gridneva Z, Gay MCL, Lai CT, Trengove RD, Hartmann PE, et al. Longitudinal study of pesticide residue levels in human milk from Western Australia during 12 months of lactation: Exposure assessment for infants. *Scientific Reports.* 2016;6:38355.
5. Nickerson K. Environmental contaminants in breast milk. *Journal of midwifery & women's health.* 2006;51(1):26-34. Epub 2006/01/10.
6. Grandjean P, Bellinger D, Bergman Å, Cordier S, Davey-Smith G, Eskenazi B, et al. The Faroes Statement: Human Health Effects of Developmental Exposure to Chemicals in Our Environment. *Basic & clinical pharmacology & toxicology.* 2008;102(2):73-5.
7. Aylward LL, Hays SM, Kirman CR, Marchitti SA, Kenneke JF, English C, et al. Relationships of chemical concentrations in maternal and cord blood: a review of available data. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews.* 2014;17(3):175-203. Epub 2014/04/23.
8. Whitehead TP, Crispo Smith S, Park J-S, Petreas MX, Rappaport SM, Metayer C. Concentrations of Persistent Organic Pollutants in California Children's Whole Blood and Residential Dust. *Environmental Science & Technology.* 2015;49(15):9331-40.
9. La Merrill, Emond C, Kim MJ, Antignac JP, Le Bizec B, Clement K, et al. Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants. *Environ Health Perspect.* 2013;121(2):162-9. Epub 2012/12/12.
10. Mead MN. Contaminants in Human Milk: Weighing the Risks against the Benefits of Breastfeeding. *Environmental Health Perspectives.* 2008;116(10):A426-A34.
11. ATSDR. Toxicological Profile for DDT, DDE and DDD. 2002.
12. Cano-Sancho G, Salmon AG, La Merrill MA. Association between Exposure to p,p'-DDT and Its Metabolite p,p'-DDE with Obesity: Integrated Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect.* 2017;125(9):096002.
13. La Merrill, Karey E, Moshier E, Lindtner C, La Frano MR, Newman JW, et al. Perinatal Exposure of Mice to the Pesticide DDT Impairs Energy Expenditure and Metabolism in Adult Female Offspring. *PloS one.* 2014;9(7):e103337.

14. Skinner MK, Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Haque M, Nilsson EE. Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity. *BMC Medicine*. 2013;11(1):228.
15. Pan IJ, Daniels JL, Herring AH, Rogan WJ, Siega-Riz AM, Goldman BD, et al. Lactational exposure to polychlorinated biphenyls, dichlorodiphenyltrichloroethane, and dichlorodiphenyldichloroethylene and infant growth: an analysis of the Pregnancy, Infection, and Nutrition Babies Study. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2010;24(3):262-71. Epub 2010/04/27.
16. Iszatt N, Stigum H, Verner MA, White RA, Govarts E, Murinova LP, et al. Prenatal and Postnatal Exposure to Persistent Organic Pollutants and Infant Growth: A Pooled Analysis of Seven European Birth Cohorts. *Environ Health Perspect*. 2015;123(7):730-6. Epub 2015/03/06.
17. Verner, Ayotte P, Muckle G, Charbonneau M, Haddad S. A Physiologically Based Pharmacokinetic Model for the Assessment of Infant Exposure to Persistent Organic Pollutants in Epidemiologic Studies. *Environmental Health Perspectives*. 2009;117(3):481-7.
18. Ulaszewska MM, Ciffroy P, Tahraoui F, Zeman FA, Capri E, Brochot C. Interpreting PCB levels in breast milk using a physiologically based pharmacokinetic model to reconstruct the dynamic exposure of Italian women. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*. 2012;22(6):601-9. Epub 2012/07/05.
19. Clewell RA, Gearhart JM. Pharmacokinetics of toxic chemicals in breast milk: use of PBPK models to predict infant exposure. *Environ Health Perspect*. 2002;110(6):A333-7. Epub 2002/06/11.
20. Tatsuta N, Nakai K, Sakamoto M, Murata K, Satoh H. Methylmercury Exposure and Developmental Outcomes in Tohoku Study of Child Development at 18 Months of Age. *Toxics*. 2018;6(3). Epub 2018/08/24.
21. Nakai K, Suzuki K, Oka T, Murata K, Sakamoto M, Okamura K, et al. The Tohoku Study of Child Development: A cohort study of effects of perinatal exposures to methylmercury and environmentally persistent organic pollutants on neurobehavioral development in Japanese children. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2004;202(3):227-37. Epub 2004/04/07.
22. Kanazawa A, Miyasita C, Okada E, Kobayashi S, Washino N, Sasaki S, et al. Blood persistent organochlorine pesticides in pregnant women in relation to physical and environmental variables in The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *The Science of the total environment*. 2012;426:73-82. Epub 2012/04/17.
23. Currie LA. Detection and quantification limits: origins and historical overview. Adapted from the Proceedings of the 1996 Joint Statistical Meetings (American Statistical Association, 1997). Original title: "Foundations and future of detection and quantification limits". Contribution of the National Institute of Standards and Technology; not subject to copyright. *1. Analytica Chimica Acta*. 1999;391(2):127-34.

24. ICRP. Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values. A report of age- and gender-related differences in the anatomical and physiological characteristics of reference individuals. ICRP Publication 89. *Annals of the ICRP*. 2002;32(3-4):5-265. Epub 2003/09/26.
25. Smith D. Worldwide trends in DDT levels in human breast milk. *Int J Epidemiol*. 1999;28(2):179-88. Epub 1999/05/26.
26. Wolff MS, Zeleniuch-Jacquotte A, Dubin N, Toniolo P. Risk of breast cancer and organochlorine exposure. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2000;9(3):271-7. Epub 2000/04/06.
27. Shrier I, Platt RW. Reducing bias through directed acyclic graphs. *BMC Medical Research Methodology*. 2008;8(1):70.
28. Arcus-Arth A, Krowech G, Zeise L. Breast milk and lipid intake distributions for assessing cumulative exposure and risk. *Journal Of Exposure Analysis And Environmental Epidemiology*. 2004;15:357.
29. Kent JC, Mitoulas L, Cox DB, Owens RA, Hartmann PE. Breast volume and milk production during extended lactation in women. *Experimental physiology*. 1999;84(2):435-47. Epub 1999/05/05.
30. World Health Organization. Child growth standards: 2017. [modifié le; cité le]. Disponible: <http://www.who.int/childgrowth/mgrs/en/>
31. World Health Organization. Body mass index - BMI: 2018. [modifié le; cité le]. Disponible: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>
32. Reilly JJ, Kelly J. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. *International journal of obesity (2005)*. 2011;35(7):891-8. Epub 2010/10/27.
33. Park MH, Falconer C, Viner RM, Kinra S. The impact of childhood obesity on morbidity and mortality in adulthood: a systematic review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2012;13(11):985-1000. Epub 2012/06/27.
34. Simmonds M, Llewellyn A, Owen CG, Woolacott N. Predicting adult obesity from childhood obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2016;17(2):95-107. Epub 2015/12/24.
35. Li J, Li N, Ma M, Giesy JP, Wang Z. In vitro profiling of the endocrine disrupting potency of organochlorine pesticides. *Toxicol Lett*. 2008;183(1-3):65-71. Epub 2008/11/11.
36. Ward AB, Dail MB, Chambers JE. In Vitro effect of DDE exposure on the regulation of lipid metabolism and secretion in McA-RH7777 hepatocytes: A potential

role in dyslipidemia which may increase the risk of type 2 diabetes mellitus. *Toxicology in vitro* : an international journal published in association with BIBRA. 2016;37:9-14. Epub 2016/10/19.

37. Tang-Peronard JL, Jensen TK, Andersen HR, Ried-Larsen M, Grontved A, Andersen LB, et al. Associations between Exposure to Persistent Organic Pollutants in Childhood and Overweight up to 12 Years Later in a Low Exposed Danish Population. *Obesity facts*. 2015;8(4):282-92. Epub 2015/08/01.

38. Warner M, Wesselink A, Harley KG, Bradman A, Kogut K, Eskenazi B. Prenatal Exposure to Dichlorodiphenyltrichloroethane and Obesity at 9 Years of Age in the CHAMACOS Study Cohort. *American Journal of Epidemiology*. 2014;179(11):1312-22.

39. Delvaux I, Van Cauwenberghe J, Den Hond E, Schoeters G, Govarts E, Nelen V, et al. Prenatal exposure to environmental contaminants and body composition at age 7–9 years. *Environmental research*. 2014;132(Supplement C):24-32.

40. Verner M-A, Chevrier J, Ngueta G, Rauch S, Bornman R, Eskenazi B. Early-life exposure to p,p'-DDT and p,p'-DDE in South African children participating in the VHEMBE study: An assessment using repeated serum measurements and pharmacokinetic modeling. *Environment International*. 2018;119:478-84.

41. Eik Anda E, Nieboer E, Dudarev AA, Sandanger TM, Odland JO. Intra- and intercompartmental associations between levels of organochlorines in maternal plasma, cord plasma and breast milk, and lead and cadmium in whole blood, for indigenous peoples of Chukotka, Russia. *Journal of environmental monitoring : JEM*. 2007;9(8):884-93. Epub 2007/08/03.

42. Llewellyn A, Simmonds M, Owen CG, Woolacott N. Childhood obesity as a predictor of morbidity in adulthood: a systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2016;17(1):56-67. Epub 2015/10/07.



## Supplemental material

**Title:** Estimated postnatal  $p,p'$ -DDT and  $p,p'$ -DDE levels in Japanese children and body mass index at 42 months of age

**Authors :** Laurence Plouffe, Delphine Rieutort, Lina Madaniyazi, Miyuki Iwai-Shimada, Kunihiro Nakai, Nozomi Tatsuta, Shoji F. Nakayama, Marc-André Verner

### Table of contents

Correlations between breastfeeding duration and areas under the curve for $p,p'$ -DDT...	48
Correlations between breastfeeding duration and areas under the curve for $p,p'$ -DDE...	49
Directed acyclic graph.....	50

Correlations between breastfeeding duration and areas under the curve for  $p,p'$ -DDT

Covariables	Breastfeeding duration	Breast milk concentration	AUC 0-6 months	AUC 6-12 months	AUC 12-24 months	Breast milk DDT x breastfeeding duration
<b>Breastfeeding duration</b>	1					
<b>Breast milk concentration</b>	-0.058 (p= 0.274)	1				
<b>AUC 0-6 months</b>	-0.028 (p= 0.597)	0.993 (p=0.00)	1			
<b>AUC 6-12 months</b>	0.146 (p= 0.006)	0.908 (p=0.00)	0.937 (p=0.00)	1		
<b>AUC 12-24 months</b>	0.308 (p= 2.77e-09)	0.841 (p=0.00)	0.872 (p=0.00)	0.979 (p=0.00)	1	
<b>Breast milk DDT x breastfeeding duration</b>	0.842 (p= 8.91e-97)	0.43 (p=0.00)	0.459 (p=0.00)	0.602 (p=0.00)	0.722 (p=0.00)	1

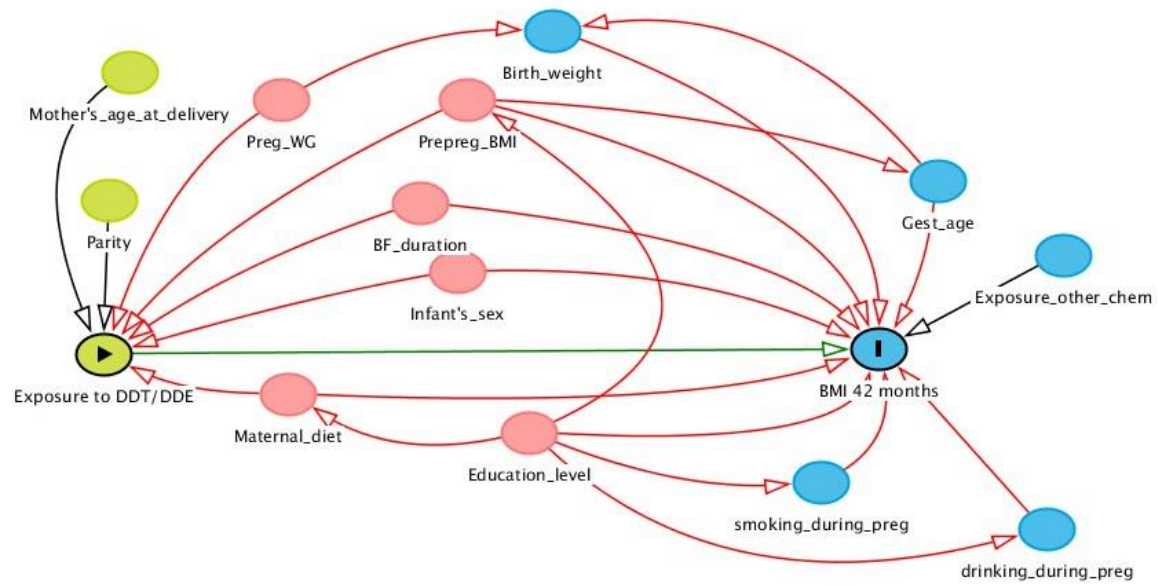
AUC: area under the curve

Correlations between breastfeeding duration and areas under the curve for *p,p'*-DDE

Covariables	Breastfeeding duration	Breast milk concentration	AUC 0-6 months	AUC 6-12 months	AUC 12-24 months	Breast milk DDE x breastfeeding duration
<b>Breastfeeding duration</b>	1					
<b>Breast milk concentration</b>	-0.056 (p= 0.296)	1				
<b>AUC 0-6 months</b>	-0.025 (p= 0.636)	0.992 (p=0.00)	1			
<b>AUC 6-12 months</b>	0.14 (p= 0.008)	0.915 (p=0.00)	0.945 (p=0.00)	1		
<b>AUC 12-24 months</b>	0.282 (p= 6.12e-08)	0.86 (p=0.00)	0.893 (p=0.00)	0.984 (p=0.00)	1	
<b>Breast milk DDE x breastfeeding duration</b>	0.962 (p=3.55e-201)	0.181 (p=6.26e-04)	0.212 (p=5.93e-05)	0.369 (p=8.38e-13)	0.5 (p=0.00)	1

AUC: area under the curve

## Directed acyclic graph



## Discussion générale et conclusion

### Évaluation de l'approche utilisée et apport de l'étude

Ce mémoire détaille les travaux effectués sur l'exposition des enfants à deux composants du DDT, soit le *p,p'*-DDT et le *p,p'*-DDE, et leur impact sur une mesure spécifique, soit l'IMC à 42 mois de vie. La plupart des études épidémiologiques s'étant concentrées sur l'exposition prénatale, nous avons choisi d'étudier les effets de l'exposition postnatale par le lait maternel.

Les résultats de cette étude s'ajoutent à ceux de plusieurs études *in vitro*, *in vivo* et épidémiologiques sur le sujet. Les études existantes ont révélé l'importance de l'exposition prénatale par rapport aux mesures de croissance et d'obésité (62, 86) et celles portant sur l'exposition postnatale par le lait maternel étaient en général non concluantes (29, 65, 67, 107). Nos résultats contrastent avec les études précédentes puisque nous avons observé des associations entre les concentrations postnatales de *p,p'*-DDE chez les enfants, principalement chez les filles, et une augmentation du score z d'IMC à 42 mois. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que nous avons utilisé la modélisation toxicocinétique afin d'estimer les niveaux d'exposition des enfants en continu, de leur conception à leurs premières années de vie. Cette technique nous a permis de contourner un obstacle fréquemment rencontré dans les études postnatales, qui est de baser ses analyses sur une unique prise de mesure d'exposition. Les travaux réalisés soulignent l'importance d'évaluer l'exposition par l'allaitement dans les études épidémiologiques et en analyse du risque.

Une interrogation reste toujours, soit la modification d'effet par le sexe. Bien que nos données pointent vers un effet plus grand pour les filles, les données existantes ne permettent pas d'identifier un mécanisme clair pouvant expliquer ce phénomène. Plusieurs hypothèses existent, notamment au niveau de la perturbation endocrinienne, mais restent à être examinées. De plus, les résultats contradictoires d'une étude à l'autre contribuent à semer l'incertitude.

### Comparaison avec d'autres études

Les concentrations mesurées dans notre étude sont similaires à ceux identifiés par la plupart des études portant sur l'exposition des enfants au DDT dans des pays où ce pesticide est

banni. Les niveaux de *p,p'*-DDE de la méta-analyse de Cano-Sancho et coll. (96) variaient toutefois beaucoup, avec des médianes allant de 1,1 à 2700 ng/g de lipide. Iszatt et coll. (86), qui ont aussi rassemblé plusieurs études sur le sujet, ont obtenu des médianes allant de 36,6 et 619,6 ng/g de lipide. Ces plages d'exposition comprennent les mesures prénatales et postnatales des études incluses. Nos mesures d'exposition au *p,p'*-DDE ressemblaient à celles mentionnées dans ce dernier article, avec une médiane de 135,5 ng/g de lipide.

Les coefficients trouvés dans notre étude sont légèrement supérieurs à celui de Cano-Sancho, mais les intervalles de confiances se chevauchent. Une seule des sept études incluses dans la méta-analyse de Cano-Sancho portait sur l'exposition postnatale. Iszatt et coll. (86), qui ont quant à eux examiné l'exposition prénatale ainsi que postnatale, ont seulement trouvé une association avec la période prénatale ( $\beta$  de 0,12 [IC 95% : 0,03 – 0,22]). Ces derniers ont utilisé le modèle toxicocinétique utilisé dans notre étude afin d'estimer l'exposition postnatale par le lait maternel.

## **Perspectives**

### **L'allaitement comme voie d'exposition**

Cette étude illustre l'importance du lait maternel en tant que voie d'exposition des jeunes enfants à une multitude de contaminants environnementaux. L'OMS recommande l'allaitement exclusif pendant les six premiers mois de vie et combiné avec d'autres sources alimentaires jusqu'à deux ans et plus (108). Cette méthode est la principale voie d'exposition de ces enfants pendant leurs premiers mois à années de vie, et cette exposition augmente avec la durée d'allaitement (29, 109). En effet, un allaitement exclusif de plus de 12 semaines serait associé à des concentrations sanguines de *p,p'*-DDE deux fois plus élevées chez les enfants de sept ans en comparaison avec les enfants nourris avec une préparation commerciale (110). Il serait pertinent d'ajouter plus fréquemment cette voie d'exposition aux études observant les effets de l'exposition prénatale ou en bas âge à des composés chimiques lipophiles persistants sur la santé des enfants. Il pourrait être intéressant de comparer les résultats de l'exposition prénatale et celle de l'exposition par l'allaitement afin d'identifier la présence de périodes critiques de la conception aux premiers mois de vie. Ces connaissances permettraient de mieux orienter la

recherche et mèneraient à des recommandations plus précises en santé publique. Il serait aussi intéressant de regarder l'effet de différents stades d'allaitement, car les concentrations de lipides changent avec le temps. Ribas-Fito et coll. (109) affirment que les niveaux de polluants organiques persistants mesurés chez les enfants seraient plus élevés chez ceux nourris avec un colostrum contenant des niveaux plus élevés de polluants organiques persistants. Ces chercheurs affirment que les niveaux mesurés dans le colostrum pourraient être un meilleur prédicteur que ceux mesurés dans le lait mature (109).

Il est toutefois important de ne pas sous-estimer les bienfaits de l'allaitement sur la santé de l'enfant et de sa mère. Selon l'OMS, l'allaitement fournit au jeune enfant tous les nutriments dont il a besoin dans une forme facilement digérable et protège contre les infections (111). Il est gratuit, facilite le lien d'attachement entre la mère et l'enfant et diminue les risques de cancer ovarien chez la femme (111). De plus, les niveaux de polluants organiques persistants diminuent avec le temps, dans les pays où leur utilisation est interdite. L'allaitement pourrait aussi avoir des effets bénéfiques sur le neurodéveloppement, ce qui contrebalancerait certains effets de l'exposition aux polluants organiques persistants (109). Bref, bien qu'il puisse y avoir des effets néfastes de l'exposition des enfants aux contaminants dans le lait maternel, les stratégies devraient viser la réduction de l'exposition des femmes plutôt que de décourager l'allaitement.

## **Utilisation de modèles toxicocinétique en recherche**

Cette étude a aussi des implications au niveau de l'utilisation de modèles toxicocinétiques ou PBPK dans la recherche épidémiologique environnementale. En effet, cette méthode peut contribuer à générer des estimations de l'exposition chez les jeunes enfants qui seraient impossibles à obtenir autrement (1). Elle nous permet de prendre en compte les changements physiologiques se produisant chez la mère et l'enfant ainsi que les caractéristiques chimiques des composés à l'étude (87), ce qui n'est pas toujours possible avec les méthodes classiques. Les profils d'exposition générés permettent aussi de visualiser des moments précis dans l'enfance et d'identifier de potentielles périodes de vulnérabilités (1, 94). La modélisation toxicocinétique ou PBPK aurait donc avantage à être plus fréquemment utilisée dans le cadre d'études épidémiologiques environnementales s'intéressant à la santé des enfants.

## Santé publique

Les résultats d'études comme la nôtre doivent être pris en compte dans l'élaboration de plans d'action contre l'épidémie d'obésité. Bien que les niveaux de *p,p'*-DDT et de *p,p'*-DDE sont en diminution, on observe un lien entre la durée d'allaitement et les niveaux mesurés chez les enfants (112). Malgré que la consommation de poisson soit la source principale d'exposition dans la population générale des pays où ce pesticide n'est plus utilisé, diminuer sa consommation pendant la grossesse n'aurait pas un grand impact sur l'exposition du fœtus et de l'enfant en raison de la longue demi-vie des polluants organiques persistants (113), et pourrait priver l'organisme en développement de nutriments bénéfiques comme les gras omégas-3.

Le DDT est encore utilisé dans certains pays afin de combattre les maladies transmises par les insectes, comme la malaria. Les effets de cette exposition sur la santé des enfants sont documentés par de nombreuses études (114, 115). Suite à la Convention de Stockholm (5), les pays utilisant ce pesticide doivent mettre sur pied un plan encadrant et ciblant la réduction de son utilisation. Plusieurs recommandations existent afin de diminuer l'exposition de cette population au DDT et à ses métabolites : l'adhésion à des règles strictes quant à l'épandage résidentiel, une meilleure éducation de la communauté et des travailleurs ainsi que la mise au point de méthode d'application et de produits plus sécuritaires (114).



## Conclusion

En conclusion, cette étude a permis d'observer une association entre l'exposition postnatale au *p,p'*-DDE sur l'IMC, une mesure centrale du développement physique. Nos résultats, bien que significatifs seulement chez les filles, soulèvent l'importance de considérer cette période d'exposition dans l'élaboration de futures recherches sur l'impact des polluants organiques persistants sur la santé des enfants ainsi que lors de l'élaboration de plans d'action en santé publique. La modélisation toxicocinétique est un bon outil pour estimer l'évolution temporelle des niveaux d'exposition, données qui seraient autrement difficiles à collecter en raison de considérations techniques et éthiques.

## Bibliographie

1. Verner, Sonneborn D, Lancz K, Muckle G, Ayotte P, Dewailly E, et al. Toxicokinetic modeling of persistent organic pollutant levels in blood from birth to 45 months of age in longitudinal birth cohort studies. *Environ Health Perspect.* 2013;121(1):131-7. Epub 2012/10/23.
2. ATSDR. Toxicological Profile for DDT, DDE and DDD. 2002.
3. EPA U. DDT – A Brief History and Status. 2017.
4. UNEP/ FAO program. Decision Guidance Documents: DDT. 1991.
5. Stockholm Convention. DDT (Dichloro-diphenyl-trichloroethane): 2008. [modifié le; cité le]. Disponible: <http://chm.pops.int/Implementation/PesticidePOPs/DDT/Overview/tabid/378/Default.aspx>
6. UNEP. Report of the effectiveness evaluation on DDT pursuant to the Article 16 of the Stockholm convention. 2016.
7. Sabljic A. ENVIRONMENTAL AND ECOLOGICAL CHEMISTRY - Volume I: EOLSS Publishers Company Limited; 2009.
8. World Health Organization. The use of DDT in malaria vector control. 2011.
9. NIH, Health & Human Services,. DDT: U.S. National Library of Medicine; 2017. [modifié le; cité le February 14 2018]. Disponible: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+50-29-3>
10. Bosch C, Grimalt JO, Fernández P. Enantiomeric fraction and isomeric composition to assess sources of DDT residues in soils. *Chemosphere.* 2015;138:40-6.
11. Wang X, Gong P, Wang C, Ren J, Yao T. A review of current knowledge and future prospects regarding persistent organic pollutants over the Tibetan Plateau. *Science of The Total Environment.* 2016;573:139-54.
12. Aichner B, Bussian B, Lehnik-Habrink P, Hein S. Levels and Spatial Distribution of Persistent Organic Pollutants in the Environment: A Case Study of German Forest Soils. *Environmental Science & Technology.* 2013;47(22):12703-14.
13. Martínez FD-B, Trejo-Acevedo A, Betanzos AF, Espinosa-Reyes G, Alegría-Torres JA, Maldonado INP. Assessment of DDT and DDE Levels in Soil, Dust, and Blood Samples From Chihuahua, Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 2012;62(2):351-8.
14. Brevik EM, Grande M, Knutzen J, Polder A, Utne Skaare J. DDT contamination of fish and sediments from Lake Ørsjøen, Southern Norway: Comparison of data from 1975 and 1994. *Chemosphere.* 1996;33(11):2189-200.

15. Barnhoorn IEJ, Bornman MS, Jansen van Rensburg C, Bouwman H. DDT residues in water, sediment, domestic and indigenous biota from a currently DDT-sprayed area. *Chemosphere*. 2009;77(9):1236-41.
16. EPA U. Health Effects Support Document for 1,1-Dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE). U.S. Environmental Protection Agency, 2008. Contrat No.: EPA-822-R-08-003.
17. Rapaport RA, Urban, N. R., Capel, P. D., Baker, J. E., Looney, B. B., Eisenreich, S. J., & Gorham, E. New DDT inputs to North America - atmospheric deposition. *Chemosphere*. 1985;14(9):1167-73.
18. Wolff MS, Zeleniuch-Jacquotte A, Dubin N, Toniolo P. Risk of breast cancer and organochlorine exposure. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2000;9(3):271-7. Epub 2000/04/06.
19. Dong J, Wang S, Shang K. Simulation of the long-term transfer and fate of DDT in Lanzhou, China. *Chemosphere*. 2010;81(4):529-35.
20. Wania F, MacKay D. Peer Reviewed: Tracking the Distribution of Persistent Organic Pollutants. *Environmental Science & Technology*. 1996;30(9):390A-6A.
21. Nadal M, Marquès M, Mari M, Domingo JL. Climate change and environmental concentrations of POPs: A review. *Environmental research*. 2015;143:177-85.
22. Kallenborn R, Halsall C, Dellong M, Carlsson P. The influence of climate change on the global distribution and fate processes of anthropogenic persistent organic pollutants. *Journal of Environmental Monitoring*. 2012;14(11):2854-69.
23. Noyes PD, McElwee MK, Miller HD, Clark BW, Van Tiem LA, Walcott KC, et al. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environment International*. 2009;35(6):971-86.
24. Gasull M, Bosch de Basea M, Puigdomenech E, Pumarega J, Porta M. Empirical analyses of the influence of diet on human concentrations of persistent organic pollutants: a systematic review of all studies conducted in Spain. *Environ Int*. 2011;37(7):1226-35. Epub 2011/06/21.
25. Mead MN. Contaminants in Human Milk: Weighing the Risks against the Benefits of Breastfeeding. *Environmental Health Perspectives*. 2008;116(10):A426-A34.
26. Al-Saleh I, Al-Doush I, Alsabbaheen A, Mohamed Gel D, Rabbah A. Levels of DDT and its metabolites in placenta, maternal and cord blood and their potential influence on neonatal anthropometric measures. *The Science of the total environment*. 2012;416:62-74. Epub 2011/12/24.
27. Tavares TM, Beretta M, Costa MC. Ratio of DDT/DDE in the all saints bay, brazil and its use in environmental management. *Chemosphere*. 1999;38(6):1445-52.

28. Malarvannan G, Takahashi S, Ikemoto T, Isobe T, Kunisue T, Sudaryanto A, et al. Contamination status and spatial distribution of organochlorine compounds in fishes from Nansei Islands, Japan. *Marine pollution bulletin*. 2011;63(5-12):541-7. Epub 2011/03/01.
29. Pan IJ, Daniels JL, Herring AH, Rogan WJ, Siega-Riz AM, Goldman BD, et al. Lactational exposure to polychlorinated biphenyls, dichlorodiphenyltrichloroethane, and dichlorodiphenyldichloroethylene and infant growth: an analysis of the Pregnancy, Infection, and Nutrition Babies Study. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2010;24(3):262-71. Epub 2010/04/27.
30. Nickerson K. Environmental contaminants in breast milk. *Journal of midwifery & women's health*. 2006;51(1):26-34. Epub 2006/01/10.
31. Tanabe S, Kunisue T. Persistent organic pollutants in human breast milk from Asian countries. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2007;146(2):400-13. Epub 2006/09/05.
32. Abdel-Rahman SM, Amidon GL, Kaul A, Lukacova V, Vinks AA, Knipp GT. Summary of the National Institute of Child Health and Human Development–Best Pharmaceuticals for Children Act Pediatric Formulation Initiatives Workshop–Pediatric Biopharmaceutics Classification System Working Group. *Clinical Therapeutics*. 2012;34(11):S11-S24.
33. Debotton N, Dahan A. A mechanistic approach to understanding oral drug absorption in pediatrics: an overview of fundamentals. *Drug Discovery Today*. 2014;19(9):1322-36.
34. J. PK, G. WC, S. DS, J. PA. The effect of oils on the lymphatic absorption of DDT. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1982;34(11):707-10.
35. Funk RS, Brown JT, Abdel-Rahman SM. Pediatric Pharmacokinetics: Human Development and Drug Disposition. *Pediatric Clinics of North America*. 2012;59(5):1001-16.
36. Waliszewski SM, Aguirre AA, Infanzon RM, Silva CS, Siliceo J. Organochlorine Pesticide Levels in Maternal Adipose Tissue, Maternal Blood Serum, Umbilical Blood Serum, and Milk from Inhabitants of Veracruz, Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2001;40(3):432-8.
37. Morgan DP, Roan CC. Absorption, Storage, and Metabolic Conversion of Ingested DDT and DDT Metabolites in Man. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1971;22(3):301-8.
38. Haddad S, Poulin P, Krishnan K. Relative lipid content as the sole mechanistic determinant of the adipose tissue:blood partition coefficients of highly lipophilic organic chemicals. *Chemosphere*. 2000;40(8):839-43. Epub 2000/03/16.
39. Smith D. Worldwide trends in DDT levels in human breast milk. *Int J Epidemiol*. 1999;28(2):179-88. Epub 1999/05/26.
40. La Merrill, Emond C, Kim MJ, Antignac JP, Le Bizec B, Clement K, et al. Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants. *Environ Health Perspect*. 2013;121(2):162-9. Epub 2012/12/12.

41. Roan C, Morgan D, Paschal EH. Urinary Excretion of DDA Following Ingestion of DDT and DDT Metabolites in Man. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1971;22(3):309-15.
42. Hayes WJ, Jr, Durham WF, Cueto C, Jr. The effect of known repeated oral doses of chlorophenothane (ddt) in man. *Journal of the American Medical Association*. 1956;162(9):890-7.
43. Siddiqui MKJ, Saxena MC. Placenta and Milk as Excretory Routes of Lipophilic Pesticides in Women. *Human Toxicology*. 1985;4(3):249-54.
44. Czaja K, Ludwicki JK, Góralczyk K, Struciński P. Effect of Age and Number of Deliveries on Mean Concentration of Organochlorine Compounds in Human Breast Milk in Poland. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1997;59(3):407-13.
45. Hayton WL. Maturation and growth of renal function: dosing renally cleared drugs in children. *AAPS pharmSci*. 2000;2(1):E3. Epub 2001/12/14.
46. Strong AL, Shi Z, Strong MJ, Miller DFB, Rusch DB, Buechlein AM, et al. Effects of the Endocrine-Disrupting Chemical DDT on Self-Renewal and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Environmental Health Perspectives*. 2015;123(1):42-8.
47. Li J, Li N, Ma M, Giesy JP, Wang Z. In vitro profiling of the endocrine disrupting potency of organochlorine pesticides. *Toxicol Lett*. 2008;183(1-3):65-71. Epub 2008/11/11.
48. Heindel JJ, Blumberg B, Cave M, Machtinger R, Mantovani A, Mendez MA, et al. Metabolism Disrupting Chemicals and Metabolic Disorders. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY). 2017;68:3-33.
49. Moreno-Aliaga MJ, Matsumura F. Effects of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane (p,p'-DDT) on 3T3-L1 and 3T3-F442A adipocyte differentiation. *Biochemical Pharmacology*. 2002;63(5):997-1007.
50. Ward AB, Dail MB, Chambers JE. In Vitro effect of DDE exposure on the regulation of lipid metabolism and secretion in McA-RH7777 hepatocytes: A potential role in dyslipidemia which may increase the risk of type 2 diabetes mellitus. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2016;37:9-14. Epub 2016/10/19.
51. Han J, Lee JE, Jin J, Lim JS, Oh N, Kim K, et al. The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development (Cambridge, England)*. 2011;138(22):5027-37. Epub 2011/10/27.
52. Mangum LH, Crow JA, Stokes JV, Howell GE, 3rd, Ross MK, Pruett SB, et al. Exposure to p,p'-DDE Alters Macrophage Reactivity and Increases Macrophage Numbers in Adipose Stromal Vascular Fraction. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2016;150(1):169-77. Epub 2016/01/10.
53. La Merrill, Karey E, Moshier E, Lindtner C, La Frano MR, Newman JW, et al. Perinatal Exposure of Mice to the Pesticide DDT Impairs Energy Expenditure and Metabolism in Adult Female Offspring. *PloS one*. 2014;9(7):e103337.

54. Skinner MK, Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Haque M, Nilsson EE. Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity. *BMC Medicine*. 2013;11(1):228.
55. Pestana D, Teixeira D, Meireles M, Marques C, Norberto S, Sá C, et al. Adipose tissue dysfunction as a central mechanism leading to dysmetabolic obesity triggered by chronic exposure to p,p'-DDE. *Scientific Reports*. 2017;7:2738.
56. Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*. 1995;375(6532):581-5. Epub 1995/06/15.
57. Warner M, Wesselink A, Harley KG, Bradman A, Kogut K, Eskenazi B. Prenatal Exposure to Dichlorodiphenyltrichloroethane and Obesity at 9 Years of Age in the CHAMACOS Study Cohort. *American Journal of Epidemiology*. 2014;179(11):1312-22.
58. Valvi D, Mendez MA, Martinez D, Grimalt JO, Torrent M, Sunyer J, et al. Prenatal concentrations of polychlorinated biphenyls, DDE, and DDT and overweight in children: a prospective birth cohort study. *Environ Health Perspect*. 2012;120(3):451-7. Epub 2011/10/27.
59. Valvi D, Mendez MA, Garcia-Esteban R, Ballester F, Ibarluzea J, Goni F, et al. Prenatal exposure to persistent organic pollutants and rapid weight gain and overweight in infancy. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2014;22(2):488-96. Epub 2013/08/22.
60. Agay-Shay K, Martinez D, Valvi D, Garcia-Esteban R, Basagana X, Robinson O, et al. Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals during Pregnancy and Weight at 7 Years of Age: A Multi-pollutant Approach. *Environ Health Perspect*. 2015;123(10):1030-7. Epub 2015/05/09.
61. Vafeiadi M, Georgiou V, Chalkiadaki G, Rantakokko P, Kiviranta H, Karachaliou M, et al. Association of Prenatal Exposure to Persistent Organic Pollutants with Obesity and Cardiometabolic Traits in Early Childhood: The Rhea Mother-Child Cohort (Crete, Greece). *Environ Health Perspect*. 2015;123(10):1015-21. Epub 2015/04/25.
62. Delvaux I, Van Cauwenberghe J, Den Hond E, Schoeters G, Govarts E, Nelen V, et al. Prenatal exposure to environmental contaminants and body composition at age 7–9 years. *Environmental research*. 2014;132(Supplement C):24-32.
63. Tang-Peronard JL, Jensen TK, Andersen HR, Ried-Larsen M, Grøntved A, Andersen LB, et al. Associations between Exposure to Persistent Organic Pollutants in Childhood and Overweight up to 12 Years Later in a Low Exposed Danish Population. *Obesity facts*. 2015;8(4):282-92. Epub 2015/08/01.
64. Cupul-Uicab LA, Klebanoff MA, Brock JW, Longnecker MP. Prenatal exposure to persistent organochlorines and childhood obesity in the US collaborative perinatal project. *Environ Health Perspect*. 2013;121(9):1103-9. Epub 2013/06/27.
65. Hoyer BB, Ramlau-Hansen CH, Henriksen TB, Pedersen HS, Goralczyk K, Zvezdai V, et al. Body mass index in young school-age children in relation to organochlorine

compounds in early life: a prospective study. *International journal of obesity* (2005). 2014;38(7):919-25. Epub 2014/04/11.

66. Wabitsch M. The acquisition of obesity: insights from cellular and genetic research. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2000;59(2):325-30. Epub 2000/08/18.

67. Du J, Gridneva Z, Gay MCL, Lai CT, Trengove RD, Hartmann PE, et al. Longitudinal study of pesticide residue levels in human milk from Western Australia during 12 months of lactation: Exposure assessment for infants. *Scientific Reports*. 2016;6:38355.

68. PNUE/UNEP. Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants. Genève: 2009.

69. Organization WH. Inventory of evaluations performed by the Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR): 2012. [modifié le; cité le]. Disponible: <http://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/pesticide?name=DDT>

70. Galal Gorchev H. JCF. A review of the dietary intakes of chemical contaminants. *Bulletin of the World Health Organization*. 1985;63(5):945-62.

71. Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian Tissue Residue Guidelines for the Protection of Wildlife Consumers of Aquatic Biota. 1999.

72. Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. 1999.

73. ATSDR USDoHaHS. ToxGuide for DDT/DD/DDE. 2002.

74. Iwasaki M, Sato I, Jin Y, Saito N, Tsuda S. PROBLEMS OF POSITIVE LIST SYSTEM REVEALED BY SURVEY OF PESTICIDE RESIDUE IN FOOD. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2007;32(2):179-84.

75. Canada Gd. Liste des substances toxiques : DDT: 2013. [modifié le 2013-07-24; cité le 2018-07-24]. Disponible: <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/gestion-substances-toxiques/liste-loi-canadienne-protection-environnement/dichlorodiphenyltrichloroethane.html>

76. Canada Gd. Rapport sur la biosurveillance humaine des substances chimiques de l'environnement au Canada: 2010. [modifié le; cité le July 24 2018]. Disponible: [https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/sante-environnement-milieu-travail/rapports-publications/contaminants-environnementaux/8-resultats-groupe-chimique-rapport-biosurveillance-humaine-substances-chimiques-environnement-canada-sante-canada-2010.html#n8\\_2](https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/sante-environnement-milieu-travail/rapports-publications/contaminants-environnementaux/8-resultats-groupe-chimique-rapport-biosurveillance-humaine-substances-chimiques-environnement-canada-sante-canada-2010.html#n8_2)

77. Canada Gd. Règlement sur certaines substances toxiques interdites. 2012. Contrat No.: DORS/2012-285.

78. Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. 1999.

79. Canada Gd. Politique de gestion des substances toxiques: 2013. [modifié le 2013-08-06; cité le 2018-07-24]. Disponible: <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/gestion-substances-toxiques/politique.html>
80. UNEP. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Geneva: 2015.
81. United Nations Economic and Social Council. The 1998 Protocol on Persistent Organic Pollutants, Including the Amendments Adopted by the Parties on 18 December 2009. 2009.
82. Santé Canada. Rapport sur la biosurveillance humaine des substances chimiques de l'environnement au Canada. 2010.
83. Zhuang X, Lu C. PBPK modeling and simulation in drug research and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2016;6(5):430-40.
84. Parham FM, Kohn MC, Matthews HB, DeRosa C, Portier CJ. Using structural information to create physiologically based pharmacokinetic models for all polychlorinated biphenyls. *Toxicology and applied pharmacology*. 1997;144(2):340-7. Epub 1997/06/01.
85. Jusko TA, De Roos AJ, Lee SY, Thevenet-Morrison K, Schwartz SM, Verner M-A, et al. A Birth Cohort Study of Maternal and Infant Serum PCB-153 and DDE Concentrations and Responses to Infant Tuberculosis Vaccination. *Environmental Health Perspectives*. 2016;124(6):813-21.
86. Iszatt N, Stigum H, Verner MA, White RA, Govarts E, Murinova LP, et al. Prenatal and Postnatal Exposure to Persistent Organic Pollutants and Infant Growth: A Pooled Analysis of Seven European Birth Cohorts. *Environ Health Perspect*. 2015;123(7):730-6. Epub 2015/03/06.
87. Clewell RA, Gearhart JM. Pharmacokinetics of toxic chemicals in breast milk: use of PBPK models to predict infant exposure. *Environ Health Perspect*. 2002;110(6):A333-7. Epub 2002/06/11.
88. Verner, Ayotte P, Muckle G, Charbonneau M, Haddad S. A Physiologically Based Pharmacokinetic Model for the Assessment of Infant Exposure to Persistent Organic Pollutants in Epidemiologic Studies. *Environmental Health Perspectives*. 2009;117(3):481-7.
89. Wolff MS. Occupationally derived chemicals in breast milk. *American journal of industrial medicine*. 1983;4(1-2):259-81. Epub 1983/01/01.
90. Lee Shelley M, Andersen ME, Fisher JW. An inhalation distribution model for the lactating mother and nursing child. *Toxicology Letters*. 1988;43(1):23-9.
91. Verner, Plusquellec P, Desjardins JL, Cartier C, Haddad S, Ayotte P, et al. Prenatal and early-life polychlorinated biphenyl (PCB) levels and behavior in Inuit preschoolers. *Environ Int*. 2015;78:90-4. Epub 2015/03/22.
92. Verner, Hart JE, Sagiv SK, Bellinger DC, Altshul LM, Korrick SA. Measured Prenatal and Estimated Postnatal Levels of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and ADHD-Related Behaviors in 8-Year-Old Children. *Environmental Health Perspectives*. 2015;123(9):888-94.



93. Gascon M, Verner MA, Guxens M, Grimalt JO, Forns J, Ibarluzea J, et al. Evaluating the neurotoxic effects of lactational exposure to persistent organic pollutants (POPs) in Spanish children. *Neurotoxicology*. 2013;34:9-15. Epub 2012/10/23.
94. Verner, Plusquellec P, Muckle G, Ayotte P, Dewailly É, Jacobson SW, et al. Alteration of infant attention and activity by polychlorinated biphenyls: Unravelling critical windows of susceptibility using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Neurotoxicology*. 2010;31(5):424-31.
95. Rogan WJ, Gladen BC, McKinney JD, Carreras N, Hardy P, Thullen J, et al. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE) in human milk: effects of maternal factors and previous lactation. *American journal of public health*. 1986;76(2):172-7. Epub 1986/02/01.
96. Cano-Sancho G, Salmon AG, La Merrill MA. Association between Exposure to p,p'-DDT and Its Metabolite p,p'-DDE with Obesity: Integrated Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect*. 2017;125(9):096002.
97. Tatsuta N, Nakai K, Sakamoto M, Murata K, Satoh H. Methylmercury Exposure and Developmental Outcomes in Tohoku Study of Child Development at 18 Months of Age. *Toxics*. 2018;6(3). Epub 2018/08/24.
98. Nakai K, Suzuki K, Oka T, Murata K, Sakamoto M, Okamura K, et al. The Tohoku Study of Child Development: A cohort study of effects of perinatal exposures to methylmercury and environmentally persistent organic pollutants on neurobehavioral development in Japanese children. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2004;202(3):227-37. Epub 2004/04/07.
99. Kanazawa A, Miyasita C, Okada E, Kobayashi S, Washino N, Sasaki S, et al. Blood persistent organochlorine pesticides in pregnant women in relation to physical and environmental variables in The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *The Science of the total environment*. 2012;426:73-82. Epub 2012/04/17.
100. Currie LA. Detection and quantification limits: origins and historical overview. Adapted from the Proceedings of the 1996 Joint Statistical Meetings (American Statistical Association, 1997). Original title: "Foundations and future of detection and quantification limits". Contribution of the National Institute of Standards and Technology; not subject to copyright. *Analytica Chimica Acta*. 1999;391(2):127-34.
101. Zhou W, Zhai Z, Wang Z, Wang L. Estimation of n-octanol/water partition coefficients (K<sub>ow</sub>) of all PCB congeners by density functional theory. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2005;755(1):137-45.
102. NIH, Health & Human Services,. DDE. U.S. National Library of Medicine; 2017.
103. ICRP. Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values. A report of age- and gender-related differences in the anatomical and physiological characteristics of reference individuals. ICRP Publication 89. *Annals of the ICRP*. 2002;32(3-4):5-265. Epub 2003/09/26.

104. Arcus-Arth A, Krowech G, Zeise L. Breast milk and lipid intake distributions for assessing cumulative exposure and risk. *Journal Of Exposure Analysis And Environmental Epidemiology*. 2004;15:357.
105. Kent JC, Mitoulas L, Cox DB, Owens RA, Hartmann PE. Breast volume and milk production during extended lactation in women. *Experimental physiology*. 1999;84(2):435-47. Epub 1999/05/05.
106. Lawrence Livermore National Laboratory. CVDOE. [modifié le; cité le]. Disponible: <https://computation.llnl.gov/projects/sundials/cvode>
107. Du J, Gridneva Z, Gay MC, Trengove RD, Hartmann PE, Geddes DT. Pesticides in human milk of Western Australian women and their influence on infant growth outcomes: A cross-sectional study. *Chemosphere*. 2017;167:247-54. Epub 2016/10/12.
108. World Health Organization. Global Strategy for Infant and Young Child Feeding. Geneva: UNICEF, 2003.
109. Ribas-Fito N, Grimalt JO, Marco E, Sala M, Mazon C, Sunyer J. Breastfeeding and concentrations of HCB and p,p'-DDE at the age of 1 year. *Environmental research*. 2005;98(1):8-13. Epub 2005/02/22.
110. Karmaus W, DeKoning EP, Kruse H, Witten J, Osius N. Early childhood determinants of organochlorine concentrations in school-aged children. *Pediatric research*. 2001;50(3):331-6. Epub 2001/08/24.
111. World Health Organization. Infant and young child feeding counselling : an integrated course. Geneva: 2006.
112. Caspersen IH, Kvaalem HE, Haugen M, Brantsaeter AL, Meltzer HM, Alexander J, et al. Determinants of plasma PCB, brominated flame retardants, and organochlorine pesticides in pregnant women and 3 year old children in The Norwegian Mother and Child Cohort Study. *Environmental research*. 2016;146:136-44. Epub 2016/01/11.
113. Binnington MJ, Quinn CL, McLachlan MS, Wania F. Evaluating the Effectiveness of Fish Consumption Advisories: Modeling Prenatal, Postnatal, and Childhood Exposures to Persistent Organic Pollutants. *Environmental Health Perspectives*. 2014;122(2):178-86.
114. Eskenazi B, Chevrier J, Rosas LG, Anderson HA, Bornman MS, Bouwman H, et al. The Pine River statement: human health consequences of DDT use. *Environ Health Perspect*. 2009;117(9):1359-67.
115. Chevrier J, Rauch S, Crause M, Obida M, Gaspar F, Bornman R, et al. Maternal Exposure to DDT and Pyrethroids and Birth Outcomes Among Residents of an Area Sprayed for Malaria Control Participating in the VHEMBE Birth Cohort Study. *Am J Epidemiol*. 2018. Epub 2018/07/12.

# Annexe 1 : Règlement sur certaines substances toxiques interdites

## Substances toxiques interdites

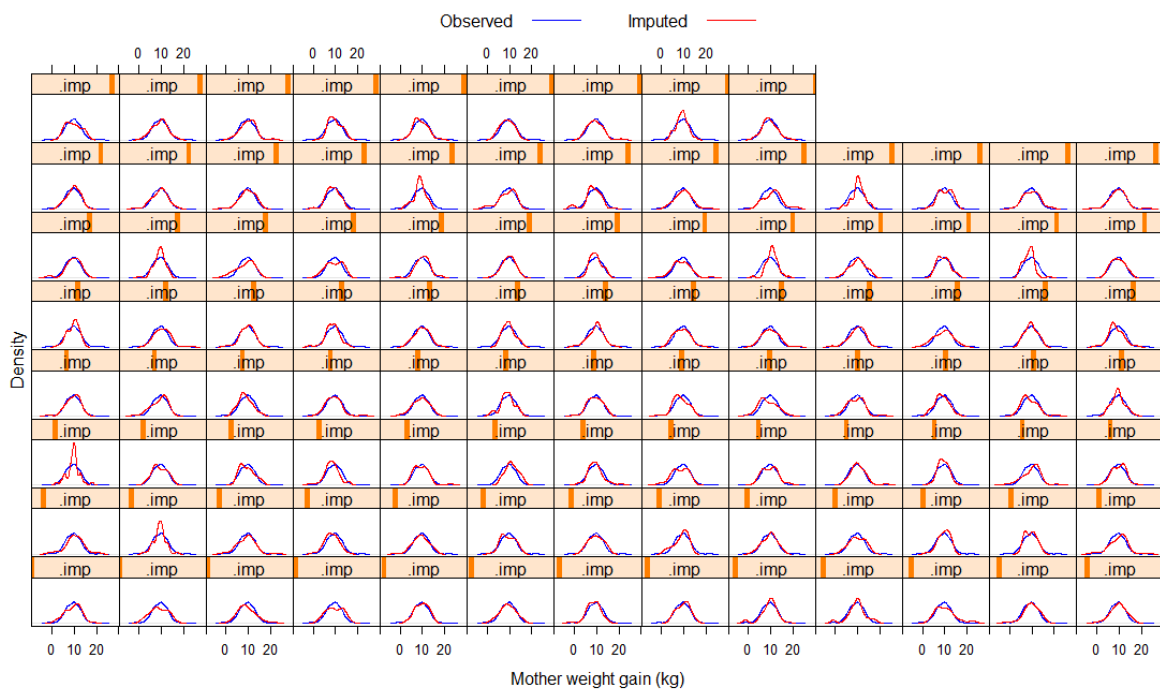
Article	Substance toxique
1	Les biphényles polybromés dont la formule moléculaire est $C_{12}H_{(10-n)}Br_n$ , où « n » est plus grand que 2
2	Les triphényles polychlorés dont la formule moléculaire est $C_{18}H_{(14-n)}Cl_n$ , où « n » est plus grand que 2
3	Les triphényles polychlorés dont la formule moléculaire est $C_{18}H_{(14-n)}Cl_n$ , où « n » est plus grand que 2
4	Éther bis(chlorométhyle) dont la formule moléculaire est $C_2H_4Cl_2O$
5	Oxyde de chlorométhyle et de méthyle dont la formule moléculaire est $C_2H_5ClO$
6	Le (4-chlorophényle) cyclopropylméthanone, O-[(4-nitrophényle)méthyl]oxime dont la formule moléculaire est $C_{17}H_{15}ClN_2O_3$
7	N-Nitrosodiméthylamine, dont la formule moléculaire est $C_2H_6N_2O$
8	Hexachlorobutadiène, dont la formule moléculaire est $C_4Cl_6$
9	Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), dont la formule moléculaire est $C_{14}H_9Cl_5$
10	Hexachlorobenzène
11	Naphtalènes polychlorés, dont la formule moléculaire est $C_{10}H_{8-n}Cl_n$ , où « n » est plus grand que 1
12	Alcanes chlorés dont la formule moléculaire est $C_nH_xCl_{(2n+2-x)}$ , où $10 \leq n \leq 13$
13	Hexabromocyclododécane, dont la formule moléculaire est $C_{12}H_{18}Br_6$

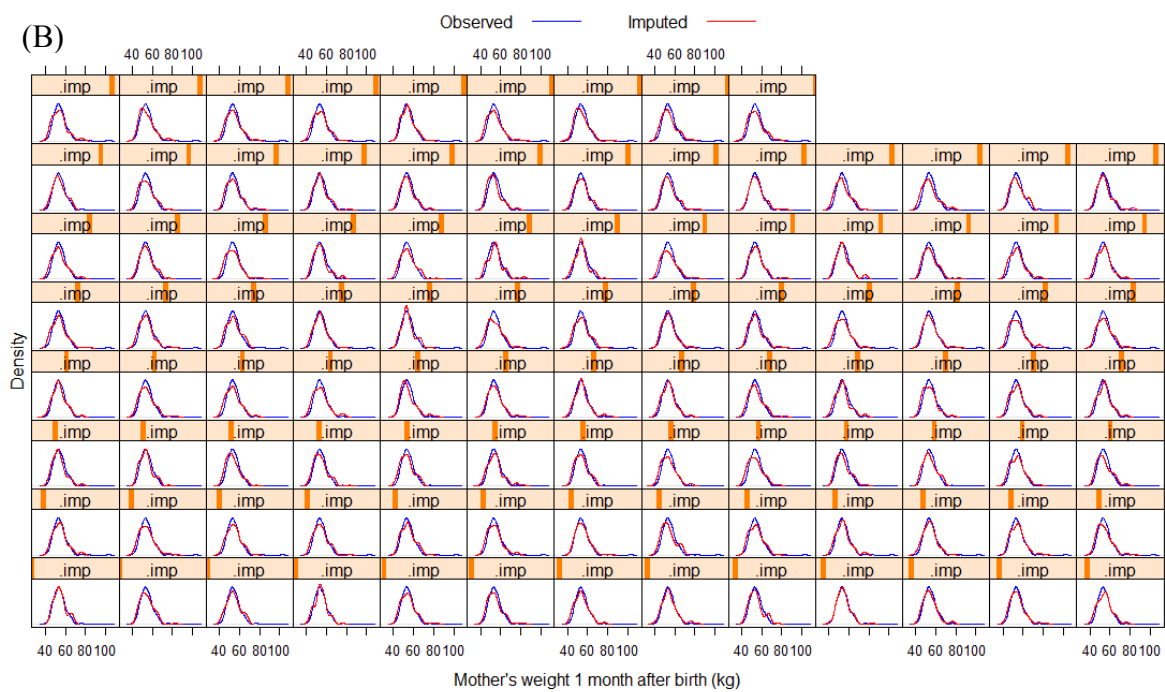
Tiré de : Canada Gd. Règlement sur certaines substances toxiques interdites. 2012. Contrat No.: DORS/2012-285.

## Annexe 2 : Distribution des données originales et imputées

Les données imputées ont été utilisées pour remplacer les valeurs manquantes de prise de poids de la mère (A) et du poids corporel de la mère un mois après la naissance (B). Les graphiques suivants comparent les distributions entre les données originales et les données imputées.

(A)





## Annexe 3 : Approbation éthique du Comité d'éthique de la recherche en santé de l'Université de Montréal



Comité d'éthique de la recherche en santé

17 mai 2017

Objet: Approbation éthique - « Évaluation de l'exposition des enfants japonais aux contaminants de l'environnement et de leurs effets sur la santé »

M. Marc-André Verner & Mme Laurence Plouffe,

Le Comité d'éthique de la recherche en santé (CERES) a étudié le projet de recherche susmentionné et a délivré le certificat d'éthique demandé suite à la satisfaction des exigences précédemment émises. Vous trouverez ci-joint une copie numérisée de votre certificat; copie également envoyée au Bureau Recherche-Développement-Valorisation.

Notez qu'il y apparaît une mention relative à un suivi annuel et que le certificat comporte une date de fin de validité. En effet, afin de répondre aux exigences éthiques en vigueur au Canada et à l'Université de Montréal, nous devons exercer un suivi annuel auprès des chercheurs et étudiants-chercheurs.

De manière à rendre ce processus le plus simple possible et afin d'en tirer pour tous le plus grand profit, nous avons élaboré un court questionnaire qui vous permettra à la fois de satisfaire aux exigences du suivi et de nous faire part de vos commentaires et de vos besoins en matière d'éthique en cours de recherche. Ce questionnaire de suivi devra être rempli annuellement jusqu'à la fin du projet et pourra nous être retourné par courriel. La validité de l'approbation éthique est conditionnelle à ce suivi. Sur réception du dernier rapport de suivi en fin de projet, votre dossier sera clos.

Il est entendu que cela ne modifie en rien l'obligation pour le chercheur, tel qu'indiqué sur le certificat d'éthique, de signaler au CERES tout incident grave dès qu'il survient ou de lui faire part de tout changement anticipé au protocole de recherche.

Nous vous prions d'agréer, Madame, Monsieur, l'expression de nos sentiments les meilleurs,

Dominique Langelier, présidente  
Comité d'éthique de la recherche en santé (CERES)  
Université de Montréal

DL/GP/gp  
c.c. Gestion des certificats, BRDV  
p.j. Certificat #17-073-CERES-D

adresse postale  
C.P. 6128, succ. Centre-ville  
Montréal QC H3C 3J7

3744 Jean-Brillant  
4e étage, bur. 430-11  
Montréal QC H3T 1P1

Téléphone : 514-343-6111 poste 2604  
ceres@umontreal.ca  
www.ceres.umontreal.ca

Comité d'éthique de la recherche en santé

## CERTIFICAT D'APPROBATION ÉTHIQUE

*Le Comité d'éthique de la recherche en santé (CERES), selon les procédures en vigueur, en vertu des documents qui lui ont été fournis, a examiné le projet de recherche suivant et conclu qu'il respecte les règles d'éthique énoncées dans la Politique sur la recherche avec des êtres humains de l'Université de Montréal.*

Projet	
<b>Titre du projet</b>	<b>Évaluation de l'exposition des enfants japonais aux contaminants de l'environnement et de leurs effets sur la santé</b>
<b>Chercheurs requérants</b>	<b>Marc-André Verner (ND)</b> , Professeur adjoint, École de santé publique - Département de santé environnementale et santé au travail <b>Laurence Plouffe (ND)</b> , Candidate à la M. Sc. en santé environnementale et santé au travail,

Financement	
Organisme	IRSC
Programme	Projet
Titre de l'octroi si différent	Évaluations de l'exposition des enfants aux composés perfluorés et aux retardeurs de flamme
Numéro d'octroi	362499
Chercheur principal	
No de compte	

### MODALITÉS D'APPLICATION

Tout changement anticipé au protocole de recherche doit être communiqué au CERES qui en évaluera l'impact au chapitre de l'éthique.

Toute interruption prématurée du projet ou tout incident grave doit être immédiatement signalé au CERES

Selon les règles universitaires en vigueur, un suivi annuel est minimalement exigé pour maintenir la validité de la présente approbation éthique, et ce, jusqu'à la fin du projet. Le questionnaire de suivi est disponible sur la page web du CERES.

Dominique Langeller, Présidente  
Comité d'éthique de la recherche en santé  
Université de Montréal

**17 mai 2017**  
Date de délivrance

**1er juin 2018**  
Date de fin de validité